

Klärung der Ursachen der Apoptoseresistenz von kutanen T-Zell-Lymphomen und Entwicklung therapeutischer Konzepte

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt – Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologe Frank Karl Horst Braun

Präsident der Humboldt – Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch – Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter: 1. PD Dr. Jürgen Eberle
 2. Dr. Michal Or-Guil
 3. Prof Dr. Peter T. Daniel

Dissertation eingereicht am 5. April 2011

Tag der mündlichen Prüfung 13. September 2011

Für
meine Eltern und meine Frau

„Wir müssen wissen. Wir werden wissen.“ (David Hilbert)

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden kutane T-Zell-Lymphome (CTCL) hinsichtlich ihrer Apoptoseregulation untersucht. Die häufigsten Entitäten sind die Mycosis fungoides, das Sézary-Syndrom sowie die Gruppe der CD30⁺ lymphoproliferativen Erkrankungen (cALCL). Todesliganden-vermittelte Apoptose ist auch für die Lymphozyten-Homöostase von essentieller Bedeutung.

Zunächst wurden die CTCL-Zelllinien hinsichtlich ihrer Apoptosesensitivität gegenüber Todesliganden untersucht und mit der von systemischen T-Zell-Lymphomzellen verglichen. Hierbei zeigte sich eine ausgesprochene Resistenz aller kutanen Zelllinien gegenüber TRAIL- und TNF- α -induzierter Apoptose. Anhand der Aktivierung der Caspasensignalkaskade war eine frühe Blockierung der Apoptose nachweisbar. Überdies konnte der Verlust von CD95 und TNF-R1 sowie von Caspase-10 und des Bcl-2-Proteins Bid in verschiedenen CTCL-Zelllinien nachgewiesen werden. Die Apoptoseresistenz konnte mit einer generellen und starken Expression des anti-apoptotischen Proteins c-FLIP korreliert werden.

Des Weiteren wurde der Einfluss von CD30-Stimulation auf die durch CD95-induzierte Apoptose in CD30⁺-Zelllinien untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Aktivierung von CD30 zu einer verminderten Sensitivität gegenüber CD95-induzierten Apoptose führt. Die Bedeutung der *in vitro*-Ergebnisse zeigte sich auch durch eine weitgehende Parallelität dieser zu untersuchten Biopsieproben von CTCL-Patienten.

Schließlich wurden verschiedene NSAIDs auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Apoptosesignalwege zu aktivieren bzw. die Expression von c-FLIP zu vermindern. Dies wurde sowohl in CTCL-Zelllinien als auch in Tumor-T-Zellen von CTCL-Patienten untersucht. Die Wirksamkeit von NSAIDs konnte auch in *ex vivo* behandelten Tumor-T-Zellen von CTCL-Patienten nachgewiesen werden, was auf einen möglichen Nutzen dieser Substanzgruppe für die CTCL-Therapie hinweist.

In Ihrer Gesamtheit vermittelt die vorliegende Arbeit einen Einblick in die komplexen Apoptoseregulationsmechanismen in kutanen T-Zell-Lymphomen und identifiziert c-FLIP als einen zentralen Resistenzfaktor.

Schlagwörter: Apoptose, CTCL, c-FLIP, Todesliganden, NSAID

Abstract

Cutaneous T cell lymphomas (CTCL) form a heterogeneous group of non-Hodgkin lymphomas with primary involvement of the skin. Its most frequent forms are Mycosis fungoides, Sézary syndrome and CD30-positive cutaneous anaplastic large-cell lymphoma. Death ligands critically contribute to lymphocyte homeostasis by induction of apoptosis and may further represent safeguard mechanisms to prevent lymphoma development and tumor growth.

First, we analyzed induction of apoptosis by death ligands in CTCL cell lines and compared it to that in systemic T-cell lymphoma cells. This revealed for CTCL cells a pronounced resistance to death ligands. In particular, there was no caspase activation in non-responsive CTCL cells, indicating an early blockade of the apoptosis signal. Furthermore a loss of CD95, TNF-R1, caspase-10, as well as of Bid was found in several cell lines. Changes at the receptor expression level were largely ruled out, whereas, consistent and strong expression of c-FLIP was correlated with resistance.

In addition, we investigated the CD30/CD95 crosstalk in CD95-sensitive cALCL cell lines. Experiments showed that CD30 ligation leads to NF- κ B-mediated c-FLIP upregulation in cALCL cells, which in turn conferred resistance to CD95-induced apoptosis. Parallels with regard to expression of apoptosis regulators were seen in peripheral blood mononuclear cells and biopsies of CTCL patients.

Finally, we evaluated non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for their capacity to downregulate c-FLIP expression and apoptosis induction in CTCL cells as well as in tumor T cells from CTCL patients. NSAID treatment resulted in an activation of both apoptosis signaling pathways and, furthermore, Diclofenac pre-treatment sensitized for TRAIL-induced apoptosis.

In conclusion, this study elucidates defects in apoptosis regulation, proved the significance of c-FLIP for the survival of CTCL cells and provides a rationale for the use of NSAIDs as a potentially new therapeutic option for CTCL patients.

Keywords: Apoptosis, CTCL, c-FLIP, death ligand, NSAID

Inhaltsverzeichnis

<i>Zusammenfassung</i>	4
<i>Abstract</i>	5
<i>Inhaltsverzeichnis</i>	6
<i>1 Einleitung</i>	10
1.1 Immunsystem	10
1.1.1 T-Lymphozyten Entwicklung	10
1.1.2 : T-Lymphozyten (CD4 ⁺)	12
1.1.3 T-Lymphozyten-Homing	12
1.1.4 Kostimulatorische Signale	13
1.2 Entzündung	14
1.3 NF-κB-Signalgebung	15
1.4 Nicht-Steroidale Anti-Inflammatorische Substanzen	17
1.5 Maligne Lymphome – Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome	19
1.5.1 Inzidenzen und Therapie von NHL	21
1.6 Apoptose	22
1.7 Nekrose im Vergleich zur Apoptose	23
1.8 Apoptosesignalwege	24
1.8.1 Der extrinsische Apoptosesignalweg	25
1.8.2 Caspasensignalkaskade	27
1.8.3 Initiatorcaspasen-Inhibitor – c-FLIP	30
1.8.4 Effektorcaspasen-Inhibitoren – IAPs	32
1.8.5 Intrinsischer (Mitochondrialer) Apoptosesignalweg	33
1.8.6 Apoptoseregulation durch die Bcl-2-Proteinfamilie	35
1.9 Alternative Zelltodmechanismen	37
1.10 Fragestellung der Arbeit	38
<i>2 Ergebnisse</i>	39
2.1 Apoptoseresistenz von CTCL-Zelllinien	39
2.2 Apoptoseresistenz korreliert mit der Blockierung der Caspasen-signalkaskade	42
2.3 Gehäufte Verlust von TNF-R1 in CTCL-Zelllinien	44
2.4 Verlust von Apoptosemediatoren und starke Expression von c-FLIP	48

2.5 Korrelation zur <i>in vivo</i> -Situation in MF/SzS-Patienten	50
2.6 CD30-vermittelte Inhibition von CD95-induzierter Apoptose	52
2.7 Aktivierbarkeit der NF- κ B-Signalwege durch CD30-Stimulation	55
2.8 CD30-Stimulation führt zu einer Verstärkung der c-FLIP-Expression	57
2.9 Wiederherstellung der Sensitivität mittels c-FLIP- <i>Knockdown</i>	58
2.10 Nachweis von Bid- und c-FLIP-Expression in Patientenproben	61
2.11 Apoptoseinduktion und verminderte Zellvitalität durch NSAIDs	63
2.12 Caspasenaktivierung durch NSAIDs	65
2.13 Aktivierung des mitochondrialen Signalweges	67
2.14 Wichtige Rolle von c-FLIP in der NSAID-induzierten Apoptose	68
2.15 Sensitivierung für TRAIL-induzierte Apoptose durch Diclofenac	71
2.16 Korrelation der Zelllinien-Daten mit <i>ex vivo</i> -Ergebnissen von primären Tumorzellen	72
3 Diskussion.....	74
3.1 Bedeutung von Apoptose für Lymphozyten und Krebs	74
3.2 Apoptosesensitivität von CTCL-Zellen	74
3.3 Aktivierung von Apoptosesignalwegen	75
3.4 Expression der Bcl-2-Proteine	77
3.5 Expression von Todesrezeptoren	77
3.6 Expression des Caspasen-Inhibitors c-FLIP	79
3.7 Einfluss von CD30-Signalgebung auf die Apoptoseregulation	79
3.8 Apoptoseresistenz durch CD30-Stimulation	80
3.9 Parallelität der <i>in vitro</i> -Ergebnisse mit der <i>in vivo</i> -Situation	81
3.10 Aktuelle Therapiestrategien für CTCL	82
3.11 Therapeutische Strategien mittels CD95	83
3.12 Therapeutische Strategie mittels TNF-R1 Re-Expression	83
3.13 CD30-vermittelte Therapiestrategien	83
3.14 TRAIL-basierte Therapiestrategien	84
3.15 HDACi	84
3.16 NF- κ B-Inhibitoren	85

3.17 Interferon und Retinoide	85
3.18 Evaluierung der anti-tumoralen Eigenschaften von NSAIDs	85
3.19 Apoptoseinduktion durch NSAIDs in CTCL-Zellen	86
3.20 c-FLIP als Zielmolekül mit zentraler Bedeutung für die Apoptose	88
<i>4 Material & Methoden</i>	<i>90</i>
4.1 Zellkultur – Zelllinien	90
4.2 Zellkultur – Kultivierung	90
4.3 Verwendete agonistische Antikörper	91
4.4 Verwendete Reagenzien	91
4.5 Sterilisation von Lösungen und Nährmedien	92
4.6 Durchflußzytometrie	92
4.7 Oberflächenexpression – TRAIL	93
4.8 Oberflächenexpression – Rezeptoren	93
4.9 Nachweismethoden – Apoptose	94
4.9.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	94
4.9.2 Propidiumjodid-Färbung	95
4.10 Nachweismethode – Zytotoxizität	96
4.11 Proteinanalytik (Westernblot-Analyse)	96
4.11.1 Herstellung von Proteinextrakten mit Standard-Lysepuffer	97
4.11.2 Verwendete Puffer und Reagenzien – Standard-Proteinlysate	97
4.11.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Methode	97
4.11.4 Herstellung von Proteinextrakten mit CHAPS-Lysepuffer	98
4.11.5 Konzentrationsbestimmung von CHAPS-Proteinextrakten	98
4.11.6 Verwendete Puffer und Reagenzien – CHAPS-Proteinextrakte	99
4.11.7 Elektrophorese – Protokoll	99
4.11.8 Verwendete Puffer und Reagenzien – Elektrophorese	99
4.11.9 Protein-Transfer-Protokoll	100
4.11.10 Verwendete Puffer und Reagenzien – Protein-Transfer	100
4.11.11 Enhanced Chemilumineszenz (ECL)	100
4.11.12 Verwendete Puffer und Reagenzien – ECL	101
4.11.13 Verwendete Antikörper: Westernblot-Analyse	101
4.12 Herstellung von Zellfraktionierungslysaten	101
4.13 Nachweismethode – mitochondriales Membranpotential ($\Delta\Psi_m$)	102

4.14 Nachweismethode – ROS (<i>reactive oxygen species</i>)	102
4.15 Nachweismethode – Zellvitalität	103
4.16 NF- κ B-Bindungsnachweis	103
4.17 Herstellung von anti-cFLIP shRNA-Lentiviren	103
4.17.1 Verwendete Puffer und Reagenzien – Virusproduktion	105
4.18 Herstellung von c-FLIP _L -überexprimierenden Zellen	105
4.19 Leukapherese isolierte PBMC von Sézary-Syndrom-Patienten	105
4.20 Immunhistologie von CTCL-Patientenbiopsien	106
4.21 Isolierung von Tumor-T-Zellen von Sézary-Syndrom-Patienten	106
4.22 Statistische Auswertung der Ergebnisse	107
<i>Literaturverzeichnis</i>	108
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	131
<i>Publikationsliste</i>	135
<i>Kongressbeiträge</i>	136
<i>Danksagung</i>	137
<i>Eidesstattliche Erklärung</i>	138

1 Einleitung

1.1 Immunsystem

Das Immunsystem ist in vielzelligen Organismen für die Bekämpfung von Infektionen, pathogenen Mikroorganismen und für die Entfernung potentiell gefährlicher, körpereigener Zellen von zentraler Bedeutung. Dabei stützt sich das Immunsystem auf zwei Säulen, zum einen auf die angeborene (unspezifische) und zum anderen auf die adaptive (spezifische) Immunantwort. Die angeborene Immunantwort erkennt konservierte Strukturen auf Pathogenen und führt zu einer schnellen Immunantwort gegen diese. Das adaptive Immunsystem ist charakterisiert durch seine hohe Spezifität in der Erkennung von Antigenen, was die Identifizierung von unterschiedlichsten Erregern ermöglicht (Chaplin, 2010). Überdies ist das adaptive Immunsystem in der Lage, veränderte körpereigene Zellen zu identifizieren und diese mittels Todesliganden-vermittelter oder Granzym B-induzierter Apoptose zu eliminieren (Igney and Krammer, 2002a).

Im Allgemeinen sind Apoptosesignalwege, die durch Todesliganden, wie zum Beispiel CD95L oder TRAIL, aktiviert werden, auch für die Selbstregulation von Immunzellen und hier vor allem für Lymphozyten von großer Bedeutung (Li-Weber and Krammer, 2003; Falschlehner *et al*, 2009). Wichtig für die korrekte Funktion des Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen körpereigen und körperfremd bzw. entartet (Medzhitov and Janeway, Jr., 2000). Störungen in der Fähigkeit zur Unterscheidung sind häufig mit Autoimmunerkrankungen assoziiert. Generell stellen verschiedene Schritte im Laufe der Entwicklung und Reifung von Immunzellen sicher, dass autoreaktive Zellen mittels Apoptose eliminiert werden. Das adaptive Immunsystem ist überdies in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis zu entwickeln, welches bei einer erneuten Begegnung mit dem gleichen Antigen zu einer schnelleren Immunantwort führt. Daher kann die physiologische Lebensdauer von Lymphozyten ein paar Stunden, im Falle von Gedächtniszellen sogar bis zu mehreren Jahren betragen (Sallusto and Lanzavecchia, 2009).

1.1.1 T-Lymphozyten Entwicklung

Pluripotente Knochenmarkstammzellen stellen den Ausgangspunkt für myeloide und lymphoide Zellen dar. Zu den wichtigsten spezifischen und hoch spezialisierten

Immunzellen zählen T- und B-Lymphozyten. T-Lymphozyten haben ihren Namen auf Grund ihrer Reifung im Thymus. Unreife Vorläufer-T-Lymphozyten wandern aus dem Knochenmark in die lymphatischen Gewebe des Thymus ein und erfahren dort in verschiedenen Schritten ihre Reifung zu naiven T-Lymphozyten. Zunächst differenzieren die Vorläuferzellen zu CD4/CD8 doppelt positiven Thymozyten (DP) aus (Abbildung 1). Anschließend findet eine Positivselektion an den kortikalen, thymischen Epithelialzellen statt, die dazu führt, dass nur noch CD4 oder CD8 an der Zelloberfläche (SP) exprimiert wird. Hieran schließt sich die sogenannte Negativselektion in der Markregion an. Die Eliminierung der nicht adäquaten T-Lymphozyten erfolgt mittels Apoptose. Thymozyten, die die Negativselektion überstanden haben, verlassen den Thymus als naive T-Zellen. Dies sind nur noch 2% – 3% der ursprünglich eingewanderten Thymozyten. Am Ende dieser Prozesse stehen reife T-Lymphozyten, die mit Hilfe des T-Zell-Rezeptors (TCR) und im Verbund mit dem Haupthistonkompatibilitätskomplex (MHC)-Klasse-I- bzw. (MHC)-Klasse-II-Komplex Antigen-Peptide erkennen können (Germain, 2002; Chaplin, 2010; Hinterberger *et al*, 2010).

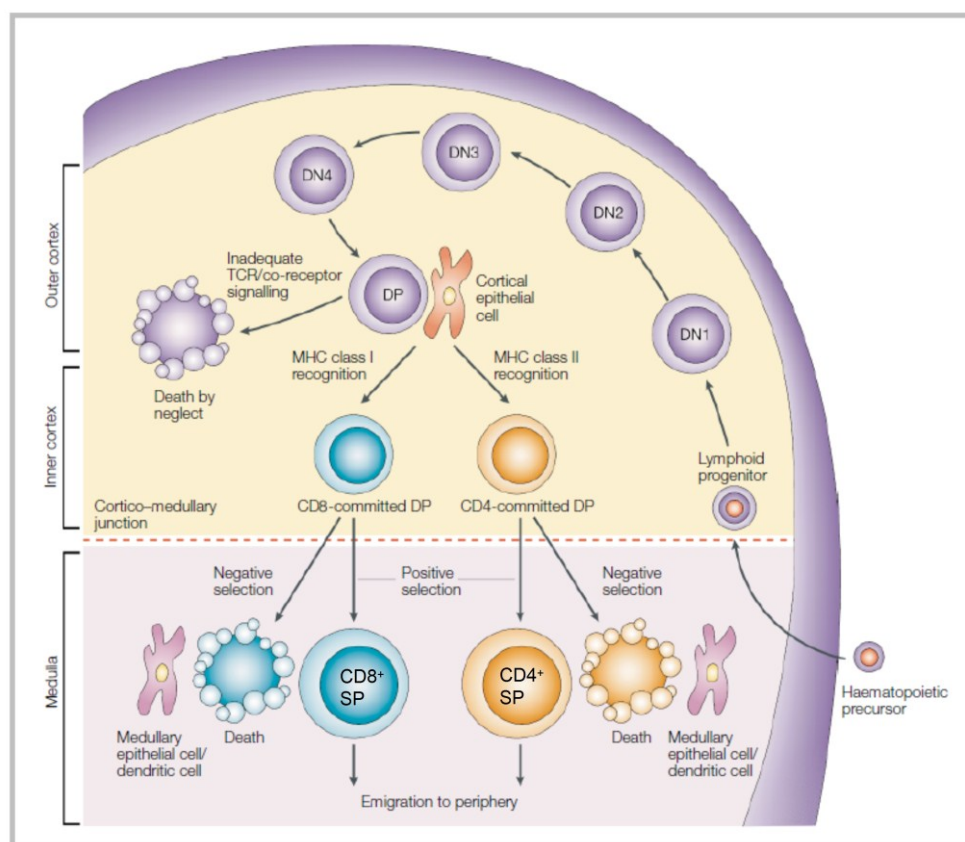


Abbildung 1

T-Lymphozyten Entwicklung. Ausgehend von hämatopoetischen Stammzellen reifen in den lymphatischen Geweben CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Germain, 2002).

1.1.2 : T-Lymphozyten (CD4⁺)

Für T-Lymphozyten ist unter anderem die Expression des T-Zell-Rezeptors (TCR) charakteristisch. Durch die sogenannte TCR-Umlagerung ist das Immunsystem theoretisch in der Lage, für jedes mögliche Peptid einen T-Lymphozyten mit dem passenden TCR zur Verfügung zu haben (Krangel, 2009). Die Erkennung von Antigenen wird über den T-Zell-Rezeptorkomplex, einem Multiproteinkomplex bestehend aus TCR und CD3, realisiert. Mit Hilfe dieses Komplexes werden Signaltransduktionskaskaden, an denen Protein-Tyrosin-Kinasen beteiligt sind, induziert, die zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (*activator protein 1*), NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) oder NF-κB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) führen (Nakayama and Yamashita, 2010; Love and Hayes, 2010).

Reife T-Lymphozyten sind neben der Expression des TCR auch durch ihr sezerniertes Zytokin-Profil (Th₁:INF-γ, Th₂:IL-4/IL-5, Th₁₇:IL-17) charakterisiert und lassen sich so in verschiedene Subgruppen unterteilen. Eine Voraussetzung für die Aktivierung von CD4-positiven T-Helferzellen stellt die Interaktion mit MHC-Klasse-II-Hilfsrezeptoren, die von antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimiert werden, dar. Für die Aktivierung sind jedoch auch kostimulatorische Rezeptoren von Bedeutung, die zur Modulation von Signalen beitragen können. Im Anschluss an eine Aktivierung differenziert ein Teil der T-Helfer-Zellen zu Gedächtniszellen, die unter anderem durch die Expression von CD45RO, CD45RA, CD29, CTLA (*cytotoxic T lymphocyte antigen*) sowie durch erhöhte Apoptoseresistenz gekennzeichnet sind (Daniels and Teixeira, 2010). Obgleich ihrer wichtigen Aufgabe, sind Gedächtniszellen nach wie vor nur zum Teil verstanden (Williams and Bevan, 2005; MacLeod *et al*, 2010).

1.1.3 T-Lymphozyten-Homing

Eine wichtige Fähigkeit, die T-Lymphozyten aufweisen müssen, um ihre Funktion im Immunsystem zu gewährleisten, ist das Einwandern in Gewebe. Die meisten reifen Lymphozyten zirkulieren permanent zwischen Blutkreislauf und Gewebe. Dies beginnt mit der Extravasation aus dem Blutkreislauf an Endothelzellen vorbei in das jeweilige Gewebe und endet mit dem Durchqueren der Lymphgewebe zurück ins Blut (Shimizu *et al*, 1992). Diese gerichtete Bewegung wird als Lymphozyten-Homing bezeichnet (Butcher and Picker, 1996).

Neben der reinen Zirkulation zwischen den verschiedenen Geweben kommt es bei aktivierten T-Zellen überdies zu einem präferentiellen Einwandern in das Gewebe, in dem die Aktivierung stattfand (Schaerli and Moser, 2005). Durch die Expression von Homing-Rezeptoren (z.B. CLA, CD44, L-Selektin, Integrin, VLA-4, LFA-1) können unterschiedliche Gewebe, wie zum Beispiel die Haut, auch gezielt infiltriert werden (Butcher and Picker, 1996; Marelli-Berg *et al*, 2008; Magro and Dyrsen, 2008). Zusätzlich können Chemokine als Botenstoffe, sezerniert von dendritischen Zellen oder Keratinozyten, eine Einwanderung von T-Zellen mit entsprechenden Chemokinrezeptoren (CCR4, CCR10, CXCR3) in Gewebe fördern (Ward and Marelli-Berg, 2009). Ein Verlust von Homing-Rezeptoren, ebenso wie die dysregulierte Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. L-Selektin), ist mit der malignen Transformation von T-Lymphozyten assoziiert (Heald *et al*, 1993; Borowitz *et al*, 1993; Burg *et al*, 2006).

1.1.4 Kostimulatorische Signale

Die Aktivierung von naïven CD4⁺ T-Zellen erfolgt nach dem Zwei-Signal-Modell, das bereits 1975 von Bretscher postuliert wurde und bis heute noch Gültigkeit besitzt (Bretscher, 2004). Nach diesem Modell benötigt eine naïve T-Zelle zwei Signale für ihre Aktivierung. Das erste Signal stellt die antigenspezifische Bindung des T-Zell-Rezeptorkomplexes (TCR-CD3) an dendritische Zellen (DC) dar. Das zweite Signal wird als kostimulatorisches Signal bezeichnet. In den letzten Jahren wurde deutlich, dass es sich bei dem kostimulatorischen Signal nicht nur um ein singuläres Ereignis handelt, sondern dass T-Lymphozyten gewissermaßen mit antigenpräsentierenden Zellen (APC) kommunizieren. Dies kann sowohl zu aktivierenden wie auch zu inhibierenden Signalen führen. Dabei handelt es sich um einen regulatorischen Vorgang, der einer physiologischen T-Zell-Aktivierung dient. Kostimulatorische Signale werden unter anderem über akzessorische Rezeptoren wie CD2, CD28, CD40 oder CD30 vermittelt (Leitner *et al*, 2010).

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde auch die Signalgebung des CD30-Rezeptors untersucht. Der CD30-Rezeptor ist ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie (TNFR-SF), die durch strukturelle und funktionelle Homologien gekennzeichnet ist (Durkop *et al*, 1992; Smith *et al*, 1994). CD30 ist auf Tumorzellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms (cHL) und des anaplastischen großzelligen T-Zell-Lymphoms (ALCL) exprimiert. Im normalen lymphatischen Gewebe sind lediglich wenige aktivierte Lymphozyten CD30-positiv (Stein *et al*, 1985; Chiarle *et al*, 1999).

Darüber hinaus findet man den Rezeptor auch auf aktivierten und virustransformierten T- und B-Lymphozyten (Froese *et al*, 1987). Die lösliche Form von CD30 (sCD30) kann sowohl in Kulturlösungen von CD30-positiven Tumorzellen als auch im Serum von Patienten mit CD30-positivem Lymphom nachgewiesen werden (Josimovic-Alasevic *et al*, 1989).

Im Vergleich zum CD30-Rezeptor ist die Expression des CD30-Liganden (CD30L) weniger eingeschränkt. Dieses Typ-II-Membranprotein findet sich auf aktivierten T-Zellen, Granulozyten, Makrophagen und auf normalen sowie malignen B-Lymphozyten (Smith *et al*, 1993; Chiarle *et al*, 1999). Die Aktivierung von CD30 kann, in Abhängigkeit des Zelltyps, unterschiedliche Signalwege induzieren, die zu Zellwachstum, Differenzierung oder auch Apoptose führen. Ein wichtiger Signalweg, der durch den CD30-Rezeptor aktiviert wird, ist der NF- κ B-Signalweg, der in anti-apoptotischen und in entzündlichen Prozessen eine wichtige Rolle spielt (Schneider and Hubinger, 2002; Schneider *et al*, 2004; Kennedy *et al*, 2006).

1.2 Entzündung

Für einen weiteren wichtigen Prozess sind die Zellen des Immunsystem von essentieller Bedeutung – der Entzündung oder Inflammation. Im Allgemeinen beginnt Inflammation, wenn es in einem Gewebe zu Irritationen durch Verletzung, Infektion oder dem Auftreten von toxischen Substanzen kommt. Dies führt zur Ansammlung von Gewebsflüssigkeit und zur Infiltration von Immunzellen in das Gewebe, wodurch es zu Schwellung, Erythema und damit zu einer weiteren Verstärkung der Inflammation kommt. Im weiteren Verlauf der Inflammation stehen dann die Reparatur der Gewebeschäden sowie die Gewebeerneuerung im Mittelpunkt (Nathan, 2002).

Im Zuge der Inflammation kommt es durch die verstärkte metabolische Aktivität in den inflammatorischen Geweben zu einem erhöhten Aufkommen von ROS (*reactive oxygene species*) und RNS (*reactive nitrogene species*). Diese freien Radikale stellen im Allgemeinen ein toxisches Nebenprodukt von metabolischer Aktivität dar und können zu Schäden an Proteinen, Lipiden und der DNS führen. Allerdings aktivieren freie Radikale auch komplexe Signalwege, die unter anderem zu einer Erhöhung des anti-oxidativen Potentials führen bzw. Mediatoren induzieren, die den ROS/RNS-induzierten Schäden entgegenwirken. Einer dieser Signalwege, den ROS und RNS aktivieren, ist der NF- κ B-Signalweg (Roberts *et al*, 2009). In der Bekämpfung von Pathogenen ist die Freisetzung

von ROS Teil des physiologischen Schutzmechanismus und im Allgemeinen können Zellen zeitlich begrenzten oxidativen Stress überstehen.

Neben dem physiologischen Nutzen von Entzündungsreaktionen, im Rahmen von Wundheilung oder in der angeborenen Immunantwort, zeigte sich in den letzten Jahren, dass es einen Zusammenhang zwischen chronischer Inflammation und der Entstehung von Krebs gibt (Mantovani *et al*, 2008). Dass hier komplexe Zusammenhänge zu berücksichtigen sind, zeigt sich auch daran, dass eine chronische Entzündung nicht per se das Krebsrisiko erhöht. Akzeptiert ist jedoch, dass Entzündungsprozesse in der Entwicklung und der Progression von Krebs eine wichtige Rolle spielen können. Viele Tumore zeigen nach ihrer Etablierung die Tendenz, eine pro-inflammatorische Mikroumgebung zu generieren (Mantovani *et al*, 2008). Von diesem Milieu scheinen Krebszellen, die auch als „Wunden, die nicht heilen“, bezeichnet wurden (Dvorak, 1986), zu profitieren. Die in Tumorgewebe präsenten, verschiedenen Immunzellen können daher durch die Sezernierung von pro-inflammatorischen Zytokinen oder Chemokinen zur Unterstützung des Tumors führen (Grivennikov *et al*, 2010).

Eine Blockierung der Zytokin- und Chemokin-vermittelten Inflammation stellt daher einen möglichen Ansatzpunkt für Krebstherapiestrategien dar (Lawrence and Fong, 2010; Demaria *et al*, 2010). In diesem Zusammenhang könnte auch der Einsatz von nicht-steroidalen anti-inflammatorischen Substanzen (NSAIDs), die auch zu einer Blockierung von NF- κ B-Signalwegen beitragen, von Interesse sein (Habens *et al*, 2005; Cuzick *et al*, 2009). Ein Vorteil von anti-inflammatorischen Therapieansätzen ist überdies, dass sie im Gegensatz zu Radio- oder Chemotherapie nicht zu Mutationen führen (Grivennikov *et al*, 2010).

1.3 NF- κ B-Signalgebung

In Säugetierzellen besteht die NF- κ B-Transkriptionsfaktorfamilie aus fünf Mitgliedern: RelA (p65), RelB, cRel, NF- κ B1 (p50 und sein Vorläufer p105) sowie NF- κ B2 (p52 und sein Vorläufer p100). Die NF- κ B-Proteine lagern sich als funktionelle Struktur zu Homo- und Heterodimeren zusammen. Grundsätzlich lassen sich zwei NF- κ B-Signalwege, der kanonische und der alternative NF- κ B-Signalweg, voneinander unterscheiden (Abbildung 2). Im Rahmen des kanonischen Signalweges kommt es hauptsächlich zur Aktivierung von RelA/p50-Dimeren. Diese liegen im unstimulierten Zustand im Zytoplasma durch I- κ B-Proteine (*inhibitor of kappa-B*) gebunden vor. Im Zuge einer Aktivierung durch eine breite Palette von Stimuli (TNF- α , IL-1, Virus-Infektion, genotoxische Substanzen oder

ionisierende Strahlung) kommt es zur Phosphorylierung der I- κ B-Proteine an Serinresten durch den IKK-Komplex (*I kappa B kinase*), was zu einer Ubiquitinierung und zum proteosomalen Abbau der I- κ B-Proteine führt. Die freigesetzten RelA/p50-Dimere translozieren in den Kern und wirken dort als Transkriptionsfaktoren. Dieser NF- κ B-Signalweg ist vor allem in der angeborenen Immunantwort und in der Inflammation von Bedeutung.

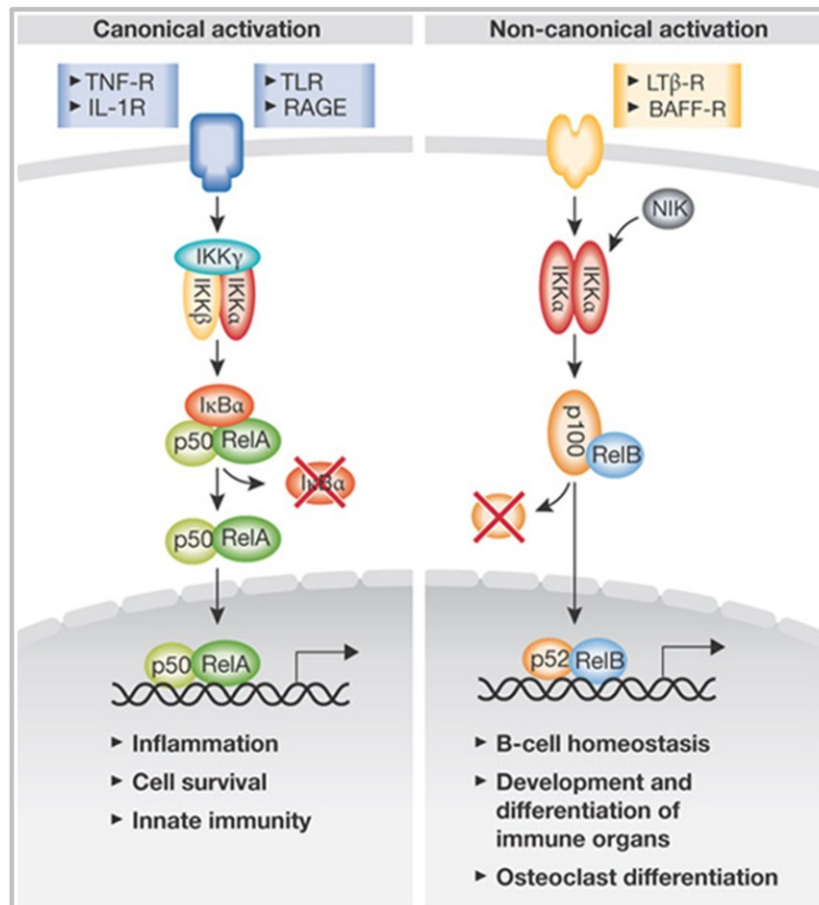


Abbildung 2

NF- κ B-Signalwege. Aktivierung des kanonischen (I- κ B α) und des NIK-abhängigen, alternativen NF- κ B-Signalweges. Für Erläuterungen siehe Abschnitt 1.3 (Bollrath and Greten, 2009).

Der zweite, alternative Signalweg zeigt sich etwas eingeschränkter hinsichtlich der ihn aktivierenden Stimuli. Hierzu zählen Mitglieder der TNF-Superfamilie (z.B. BAFF), Lymphotoxin β (LT β) oder der CD40-Ligand. In diesem Signalweg wird IKK α durch NIK (*NF- κ B-inducing kinase*) aktiviert, woraufhin IKK α p100, den wichtigsten RelB-Inhibitor, phosphoryliert und dem proteosomalen Abbau zuführt. Die RelB/p52- oder RelB/p50-Dimere translozieren in den Kern und führen zur Transkription von Genen. Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass dieser Signalweg überwiegend in der

Entwicklung, Organisation und Funktion von sekundären lymphatischen Organen sowie in der B-Zell-Reifung eine Rolle spielt. In der Aktivierung beider NF- κ B-Signalwege ist der IKK-Komplex von zentraler Bedeutung. Dieser besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten, IKK α und IKK β , sowie einer regulatorischen Untereinheit, IKK γ (NEMO) (Baud and Karin, 2009).

Eine Blockierung von Inflammation und NF- κ B-Signalwegen ist auf Grund ihrer Involvierung in Zellwachstum und Apoptoseresistenz auch therapeutisch relevant. Anti-apoptotische NF- κ B-Zielproteine sind neben Bcl-2- und IAP-Proteinen auch der Caspasen-Inhibitor c-FLIP (Micheau *et al*, 2001; Karin, 2006a; Karin, 2009; Vallabhapurapu and Karin, 2009).

1.4 Nicht-Steroidale Anti-Inflammatorische Substanzen

Nicht-steroidale anti-inflammatorische Substanzen (NSAIDs) werden seit langem für die Behandlung von Schmerzen und Entzündungen eingesetzt. In vergangenen Jahren konnte für diese Substanzklasse auch eine anti-neoplastische Aktivität nachgewiesen werden (Cha and DuBois, 2007). Für die schmerzstillende und anti-entzündliche Wirkung von NSAIDs ist die Inhibition von Cyclooxygenasen (COX) verantwortlich. Zurzeit sind drei Isoformen, COX-1, -2 und -3, beschrieben, wobei über COX-3 noch wenig bekannt ist. Für COX-1 ist eine ubiquitäre Expression in verschiedenen Geweben sowie eine wichtige Rolle für den Gastrointestinaltrakt nachgewiesen. Im Gegensatz dazu ist die Expression von COX-2 induzierbar, zum Beispiel durch Inflammation (Rouzer and Marnett, 2009).

Im Allgemeinen können NSAIDs in zwei Gruppen eingeteilt werden: zum einen in die selektiven COX-2-Inhibitoren (Coxibe), wie zum Beispiel Celecoxib, und zum anderen in die nicht-selektiven COX-Inhibitoren, die sowohl COX-1 als auch COX-2 blockieren können. Beispiele für diese Gruppe sind Sulindac, Acetylsalicylsäure (ASA), Natriumsalicylat (NaS) oder Diclofenac (DF). Coxibe wurden als Alternative zu nicht-selektiven NSAIDs und deren Nebenwirkungen entwickelt (Warner *et al*, 1999). Es zeigte sich jedoch, dass Coxibe zwar deutlich magenfreundlicher sind, aber unerwartet negative Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System haben. Dies hatte sogar die Rücknahme von Medikamenten dieser Substanzgruppe zur Folge (Hinz *et al*, 2007). Cyclooxygenasen, die ein wichtiges Ziel der NSAIDs darstellen, sind für die Synthese von Prostaglandinen (PG) aus Arachidonsäure von Bedeutung (Samuelsson *et al*, 2007; Kang *et al*, 2007). Vor allem das Prostaglandin E₂ (PGE₂) zeigte sich als pro-proliferativ und mit dem Wachstum von Krebszellen assoziiert. PGE₂ wird sezerniert und führt über die Bindung an

Prostaglandin E-Rezeptoren (EP1-4) zur Aktivierung von verschiedenen pro-proliferativen und anti-apoptotischen Signalwegen (Abbildung 3) (Fecker *et al*, 2007; Sugimoto and Narumiya, 2007). Eine veränderte Expression von COX-2 wurde im Kolorektalkarzinom (Clevers, 2006), kutanem Plattenepithelkarzinom (Fecker *et al*, 2010b) sowie in hämatologischen Erkrankungen (Ladetto *et al*, 2005; Ohsawa *et al*, 2006; Kopp *et al*, 2010) mit Angiogenese, Metastasierung und anti-apoptotischer Signalgebung assoziiert. Überdies besteht ein Zusammenhang zwischen der durch chronische Inflammation verstärkten COX-2-Expression und der Entwicklung bzw. Förderung von Krebs (Subbaramaiah and Dannenberg, 2003; Harris, 2007; Grivennikov and Karin, 2010).

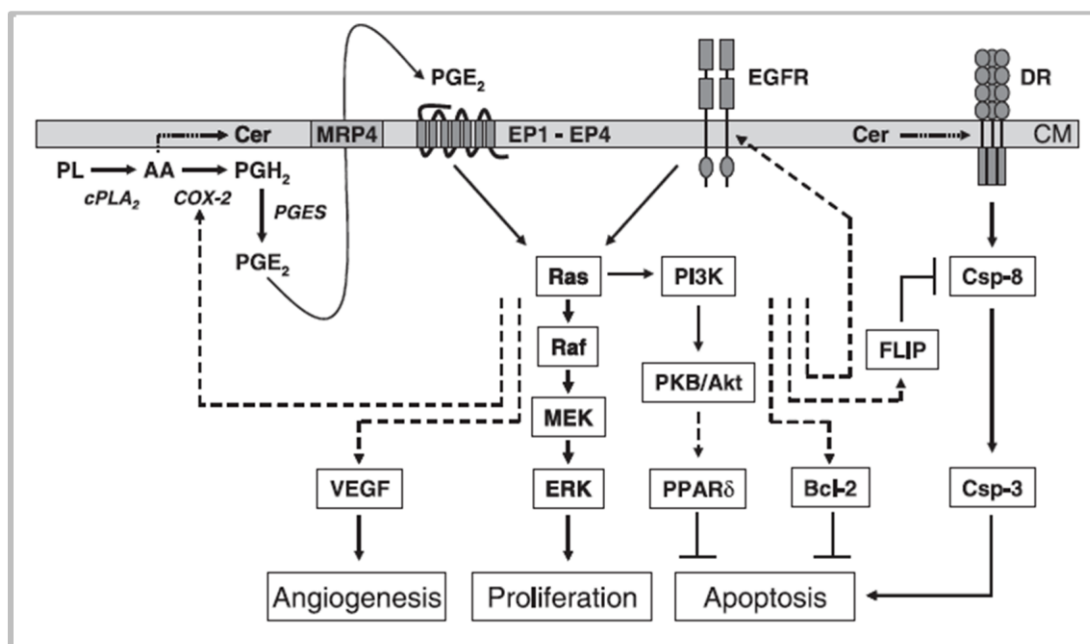


Abbildung 3

Signalwege, die durch Prostaglandin E₂ (PGE₂) aktiviert werden können (Fecker *et al*, 2007).

Jedoch schränken die bei einer Langzeiteinnahme von hohen Dosen von NSAIDs auftretenden, zum Teil schweren Nebenwirkungen die Einsatzmöglichkeiten von NSAIDs ein. Dennoch haben sich NSAIDs als wirksam in der Bekämpfung von Tumoren gezeigt und sogar prophylaktische Effekte konnten nachgewiesen werden (Gupta and DuBois, 2001; Thun *et al*, 2002). In verschiedenen Studien wurde die Wirkung von NSAIDs in unterschiedlichen Tumorentitäten evaluiert, wie zum Beispiel bei Brustkrebs (Gierach *et al*, 2008), Prostatakrebs (Liu *et al*, 2006a), Kolorektalkarzinomen (Thun *et al*, 2002), Lungenkrebs (Hosomi *et al*, 2000; Liu *et al*, 2006b), Magenkrebs (Wong *et al*, 1999) oder Lymphomen (Bellosillo *et al*, 1998; Jendrossek *et al*, 2003; Subhashini *et al*, 2005). Vor

allem für Personen mit FAP (Familiäre Adenomatöse Polyposis), die ein erhöhtes Risiko haben, Kolorektalkarzinome zu entwickeln, zeigte sich, dass NSAIDs dieses Risiko deutlich senken können (Steinbach *et al*, 2000; Cuzick *et al*, 2009). Trotz der anti-tumoralen Aktivität von NSAIDs erfolgt eine prophylaktische Einnahme nur bei Personengruppen (z.B. mit FAP) mit einem besonders erhöhten Krebsrisiko.

Neben der Inhibition der COX-2 haben NSAIDs weitere, COX-unabhängige, Wirkungen, die ebenfalls zur anti-tumoralen Aktivität beitragen können (Jana, 2008). Hierzu zählen unter anderem die Blockierung von NF- κ B-Signalwegen (Kopp and Ghosh, 1994; Grilli *et al*, 1996; Din *et al*, 2004; Grosch *et al*, 2006), die Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR- γ (He *et al*, 1999; Wu *et al*, 2003), der Abbau von β -Catenin (Dihlmann *et al*, 2003) sowie die Expression von p21 (Huls *et al*, 2003). Obwohl NSAIDs seit geraumer Zeit untersucht werden, ist im Vergleich zu anderen Tumorentitäten der Erkenntnisstand bezüglich der Wirkung von NSAIDs in T-Zell-Lymphomen noch gering (Elwood *et al*, 2009).

1.5 Maligne Lymphome – Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome

Als Lymphome werden Erkrankungen entarteter Zellen des lymphatischen Gewebes bezeichnet. Alle Lymphome lassen sich in eine von zwei Gruppen einteilen: in Hodgkin-Lymphome (HL) oder in Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). Hodgkin-Lymphome sind nach dem Arzt Thomas Hodgkin benannt, der die Erkrankung 1832 als erster beschrieb. HL-Zellen exprimieren typischerweise CD30 und sind durch Hodgkin- bzw. Reed-Sternberg-Zellen charakterisiert. Sie stammen überwiegend von B-Lymphozyten ab.

Primär kutane Lymphome (CL) unterscheiden sich von anderen NHL sowohl in ihren klinischen als auch in ihren biologischen Eigenschaften. Auch stammen CL im Gegensatz zu den systemischen Lymphomen häufig von T-Lymphozyten (75%) ab (Groves *et al*, 2000; Bassan *et al*, 2004). Die Klassifikation der primär kutanen NHL erfolgt entsprechend dem WHO/EORTC-Klassifikationssystem aus dem Jahr 2005. In diese aktuelle Klassifikation wurden neben klinischen Parametern auch morphologische, immunologische und genetische Kriterien einbezogen (Willemze *et al*, 2005; Burg *et al*, 2006). Die Stadieneinteilung für MF/SzS erfolgt nach der ISCL/EORTC-TNM-Klassifikation (Horwitz *et al*, 2008; Mestel *et al*, 2008).

Kutane T-Zell-Lymphome (CTCL) sind durch eine klonale Vermehrung von malignen T-Lymphozyten in der Haut gekennzeichnet, die zum Zeitpunkt der Diagnose nicht in anderen Organen nachweisbar sind (Willemze *et al*, 2005). Typischerweise ist der

Immunphänotyp von CTCL-Zellen dem von Gedächtniszellen ähnlich und ist durch die Expression von CD4, CD45RO und CLA gekennzeichnet. Die häufigsten kutanen T-Zell-Lymphome sind die Mycosis fungoides (MF), das Sézary-Syndrom (SzS) sowie die Gruppe der CD30-positiven lymphoproliferativen Erkrankungen (Abbildung 4, Tabelle 1) (Willemze *et al*, 2005; Burg *et al*, 2005).

Tabelle 1 Relative Häufigkeit und 5-Jahresüberlebensraten von Patienten mit primär kutanen Lymphomen entsprechend der WHO-EORTC-Klassifikation (verändert nach (Willemze *et al*, 2005)).

WHO-EORTC Klassifikation	Häufigkeit %	5-Jahresüberlebensrate %
Indolenter klinischer Verlauf		
Mycosis fungoides (MF)	44	88
Folliculotrope MF	4	80
Primär kutanes anaplastisches großzelliges Lymphom (cALCL)	8	95
Lymphomatoide Papulose	12	100
Aggressiver klinischer Verlauf		
Sézary-Syndrom (SzS)	3	24
Primär kutane periphere T-Zell-Lymphome, unspezifiziert	2	16

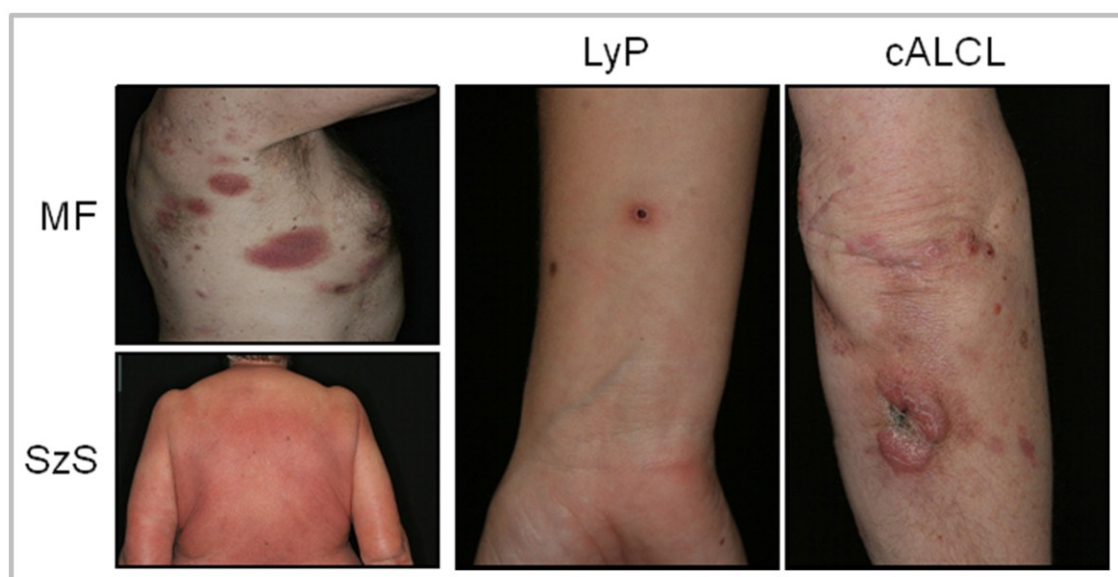


Abbildung 4

Patienten mit verschiedenen kutanen Non-Hodgkin-Lymphomen. Mycosis fungoides (MF), Sézary-Syndrom (SzS), Lymphomatoide Papulose (LyP) und kutanes anaplastisches großzelliges Lymphom (cALCL).

Den CD30-positiven lymphoproliferativen Erkrankungen lassen sich die nicht-aggressive Lymphomatoide Papulose (LyP) und das aggressive CD30-positive kutane anaplastische großzellige Lymphom (cALCL) zuordnen. Die Tumorzellen dieser Entität zeichnen sich durch ihre Zellgröße sowie der Expression von CD30 aus (Stein *et al*, 2000; Kadin, 2006). Auch heute noch sind die der Pathogenese von CTCL zugrundeliegenden Mechanismen erst zum Teil aufgeklärt (Beyer M *et al*, 2011).

1.5.1 Inzidenzen und Therapie von NHL

Lymphome sind im Vergleich zu Organumoren wie Brust-, Darm-, Prostata- oder Lungenkrebs eher selten (Abbildung 5). Für viele westliche Industrienationen liegt die Inzidenz für Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) bei 10-20 Fällen je 100.000 Personen pro Jahr. Am häufigsten erkranken dabei Menschen im höheren Lebensalter, etwa zwischen dem 50. bis 70. Lebensjahr, wobei Männer häufiger als Frauen betroffen sind (Muller *et al*, 2005; Husmann G *et al*, 2010).

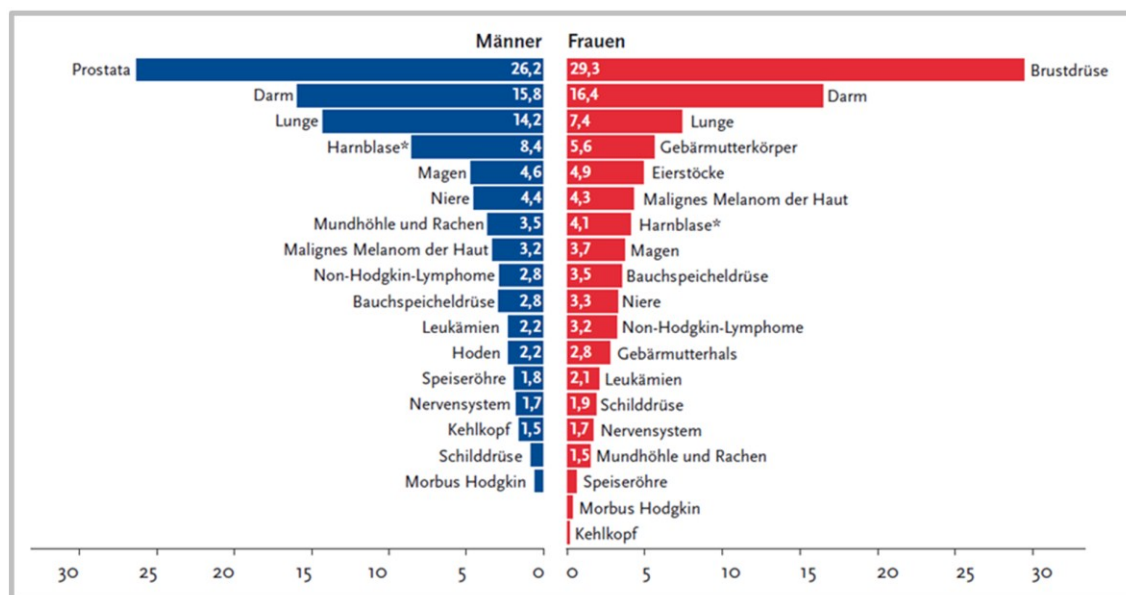


Abbildung 5

Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen für Deutschland (Stand 2006) (Husmann G *et al*, 2010).

Während die Lebenserwartung von MF-Patienten mit ausschließlicher Haut-Beteiligung noch relativ gut ist, verschlechtert sich die Prognose, wenn eine Beteiligung der Lymphknoten vorliegt bzw. es zusätzlich zu einer Involvierung von Organen kommt (Kim *et al*, 1996; Whittaker and Foss, 2007). Von den zurzeit verfügbaren Therapien stellt allein die allogene Stammzelltransplantation eine Heilung in Aussicht. Jedoch ist dieser Eingriff

mit zum Teil tödlich verlaufenden Komplikationen verbunden. Da auch der Einsatz von Chemotherapie in frühen Stadien zu keiner Heilung führt, wird bei den meisten CTCL-Formen eine stadiengerechte, eher zurückhaltende Therapie durchgeführt (Horwitz *et al*, 2008). Neben CTCL-spezifischen Medikamenten wie Bexaroten, Denileukin Diftitox und Vorinostat werden auch topische Steroide, Mechlorethamin, Interferon- α oder Chemotherapien eingesetzt. Ebenso findet die extrakorporale Photophorese oder die Phototherapie in der CTCL-Therapie Anwendung (Mestel *et al*, 2008; Klemke and Goerdts, 2008; Lansigan and Foss, 2010). In den fortgeschrittenen Stadien steht auf Grund des seltenen kurativen Erfolges der Therapiestrategien auch die Verbesserung der Lebensqualität im Vordergrund (Demierre *et al*, 2006).

1.6 Apoptose

Der Begriff Apoptose leitet sich vom griechischen *apo* „ab“ und *ptosis* „fallen“ ab und bezeichnet dort das Herabfallen von Blättern im Herbst. In der Biologie wird der Begriff verwendet, um das Absterben von Zellen nach einem definierten Programm zu beschreiben. Daher wird Apoptose auch als programmierter Zelltod bezeichnet (Lockshin and Williams, 1964; Kerr *et al*, 1972). Grundlegende Arbeiten zur Apoptose wurden 1977 an dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass immer eine gleiche Anzahl von Zellen, nämlich 131 von 1090, im Verlauf der Entwicklung des Nematoden mittels Apoptose eliminiert werden (Sulston and Horvitz, 1977).

Charakteristisch für apoptotische Zellen ist das Schrumpfen der Zellen, die Chromatinkondensation, die DNS-Fragmentierung sowie die Aufrechterhaltung der Membranintegrität (Ellis *et al*, 1991). Während der Apoptose schnüren sich exozytotische Membranvesikel von der Plasmamembran ab, die die Fragmente der Zelle enthalten und als apoptotische Körperchen (*apoptotic bodies*) bezeichnet werden. Letztendlich werden diese Vesikel durch Makrophagen und Nachbarzellen aufgenommen, dadurch kommt es zu keiner Freisetzung von zytosolischen Bestandteilen in den extrazellulären Raum, weshalb es im Verlauf des apoptotischen Zelltodes zu keiner nennenswerten Entzündungsreaktion kommt (Hengartner, 2000; Harada and Grant, 2003).

Generell handelt es sich bei der Apoptose um einen aktiven, ATP-abhängigen sowie strikt regulierten biochemischen Prozess. Apoptose ist für vielzellige Organismen ein grundlegender Mechanismus, der neben der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase auch für die Entwicklung von Immunzellen von Bedeutung ist (Brenner *et al*, 2008). Jede Zelle

des menschlichen Körpers verfügt über die Möglichkeit, Apoptosesignalwege zu aktivieren und sich so aus dem Zellverbund zu entfernen (altruistischer Zelltod).

Dysregulationen in Apoptosesignalwegen spielen bei verschiedenen Erkrankungen eine wichtige Rolle. So sind Veränderungen, die zu einer verstärkten Apoptose führen, bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson beschrieben. Im Gegensatz dazu kann ein Mangel an Apoptose, zum Beispiel bei der Entwicklung von Lymphozyten, zu Autoimmunerkrankungen führen (Goldin and Landgren, 2009). Ebenso steht die Suppression von Apoptosesignalwegen klar mit der Entstehung und der malignen Transformation von Zellen in Zusammenhang (Vermeulen *et al*, 2005). Dies kann sowohl durch inaktivierende Mutationen pro-apoptotischer Gene als auch durch die Überexpression anti-apoptotischer Faktoren geschehen. Derart veränderte Zellen entziehen sich auf Grund ihrer Apoptoseresistenz sowohl der Selbstkontrolle als auch der Kontrolle durch das Immunsystem (Igney and Krammer, 2002b; Kim *et al*, 2005). Dies kann dann zu ungehemmten Wachstum der Zellen führen und zur Entstehung von Therapieresistenzen beitragen (Eberle *et al*, 2007a; Fulda, 2009). Daher stellt die Induktion bzw. die Sensitivierung für Apoptose eine wichtige Strategie in der Bekämpfung von Krebs dar.

1.7 Nekrose im Vergleich zur Apoptose

Ein weiterer gut untersuchter Zelltodmechanismus, neben der Apoptose, stellt die Nekrose dar. Im Gegensatz zur aktiv regulierten und physiologisch sinnvollen Apoptose kann die Nekrose in der Regel als „Unfalltod“ der Zelle beschrieben werden. Obwohl unter pathologischen Bedingungen Apoptose und Nekrose koexistieren oder ineinander übergehen können, lässt sich doch anhand charakteristischer morphologischer und biochemischer Merkmale zwischen beiden Prozessen unterscheiden (Abbildung 6) (Nicotera and Merlino, 2004; Galluzzi *et al*, 2009).

Nach mechanischer Verletzung, Unterversorgung mit Blut (Ischämie) oder Sauerstoff (Hypoxie) oder Bakterieninfektion der Zelle kann es zu nekrotischem Zelltod kommen. Durch die beschädigte Plasmamembran strömt Wasser in die Zelle und bringt diese zum Platzen. Dies führt dazu, dass Bestandteile des Zytosols in den Extrazellularraum gelangen und dort Entzündungsreaktionen auslösen, wodurch das betroffene Gewebe häufig vernarbt. Da Nekrose nicht energieabhängig ist, kann es auch zu nekrotischem Zelltod kommen, wenn eine Apoptoseinduktion ohne ausreichende Energieversorgung vorliegt (Fink and Cookson, 2005).

Wenngleich Nekrose gemeinhin als Unfalltod von Zellen beschrieben wird, so weisen neuere Ergebnisse darauf hin, dass auch hier spezifische Signalwege aktiviert werden. Da die beteiligten Signalwege auch im Verlauf der Apoptose aktiviert werden, kam es zur Prägung des Begriffes Nekroptose oder programmierter Nekrose (Degterev and Yuan, 2008; Hitomi *et al*, 2008; Vandenabeele *et al*, 2010).

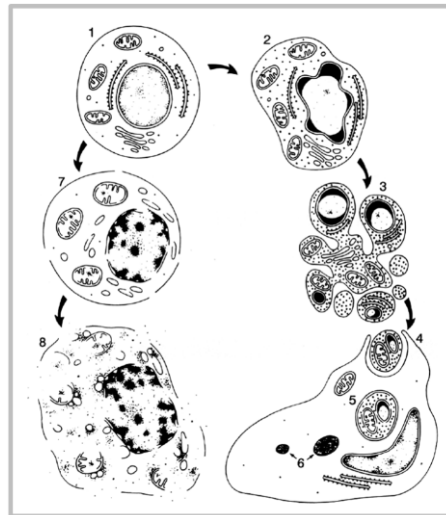


Abbildung 6

Darstellung einer apoptotischen (rechts) und nekrotischen (links) Zelle. Ausgehend von einer normalen Zelle (1) zeigt sich im Zuge der Apoptose eine Kondensation des Chromatins (2), eine Zellschrumpfung sowie die Abschnürung von apoptotischen Körperchen (3) und letztendlich die Aufnahme dieser durch Nachbarzellen (4). Im Gegensatz dazu ist die Nekrose durch ein Anschwellen der Zellen und einem Aufbrechen der Zellmembran (7) und letztendlich einem „Auslaufen“ der Zelle (8) und der Induktion von Inflammation gekennzeichnet (Kerr, 1995).

1.8 Apoptosesignalwege

In der Apoptoseregulation lassen sich im Allgemeinen zwei Signalwege voneinander unterscheiden. Zum einen der extrinsische, Todesliganden/Todesrezeptor-vermittelte Apoptosesignalweg und zum anderen der intrinsische, mitochondriale Apoptosesignalweg (Abbildung 7) (Hengartner, 2000; Harada and Grant, 2003; Fulda and Debatin, 2006). Beide Signalwege sind über das Bcl-2-Protein Bid (*BH3-interacting domain death agonist*) miteinander verbunden und können sich so gegenseitig beeinflussen (Li *et al*, 1998; Youle and Strasser, 2008). Beide Signalwege aktivieren die Caspasensignalkaskade, die maßgeblich an der Ausprägung der für die Apoptose charakteristischen Merkmale beteiligt ist.

Neben den für die Regulation des mitochondrialen Apoptosesignalweges wichtigen Bcl-2-Proteinen sind weitere inhibitorische Apoptosemediatoren wie c-FLIP im Bereich des DISC (*death-inducing signaling complex*) und die IAP-Proteinfamilie (*inhibitor of apoptosis proteins*) auf der Ebene der Effektorcaspasen bzw. der Initiatorcaspase-9 für die Apoptoseregulation von Bedeutung.

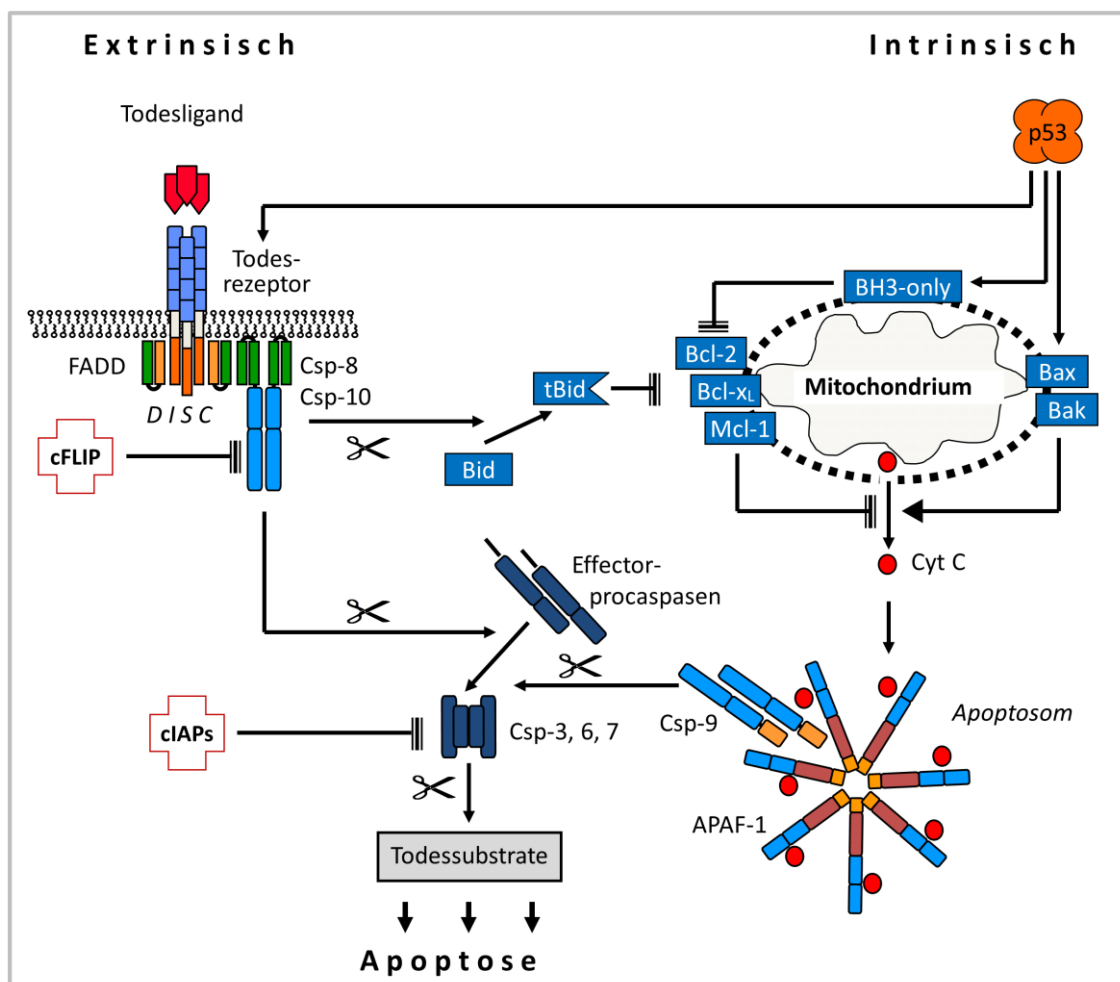


Abbildung 7

Apoptosesignalwege. Dargestellt sind der extrinsische und der intrinsische Apoptosesignalweg. Die Spaltung und damit Aktivierung von Caspasen ist durch (✂) gekennzeichnet. Erläuterungen siehe Abschnitt 1.8 (Eberle *et al.*, 2007b).

1.8.1 Der extrinsische Apoptosesignalweg

Der extrinsische Signalweg wird durch die Bindung von Todesliganden wie CD95L, TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) oder TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) an entsprechende Todesrezeptoren (CD95, TRAIL-R1, -R2 oder TNF-R1), die zur TNF-Rezeptor-Superfamilie gehören, initialisiert und führt typischerweise zur

Aktivierung der Caspasensignalkaskade (Wang and El Deiry, 2003; Lavrik *et al*, 2005; Krammer *et al*, 2007). Neben der Aktivierung der Caspasensignalkaskade kann es auch zu einer Aktivierung von NF- κ B-Signalwegen durch die Anlagerung von anderen Adapterproteinen an den zytoplasmatischen Teil der Todesrezeptoren kommen (Abbildung 8) (Di Pietro and Zauli, 2004; Nicotera *et al*, 2007).

Die Expression von sogenannten TRAIL-Decoy-Rezeptoren (TRAIL-R4/DcR1 und TRAIL-R5/DcR2) kann zu einer Blockierung von TRAIL-vermittelten Apoptosesignalen führen. Diese Gruppe von Todesrezeptoren sind zwar zur Bindung von TRAIL fähig, verfügen jedoch über keine oder nicht funktionelle zytoplasmatische Todesdomäne, wodurch keine DISC-Formierung stattfindet (Abbildung 8) (Mahalingam *et al*, 2009).

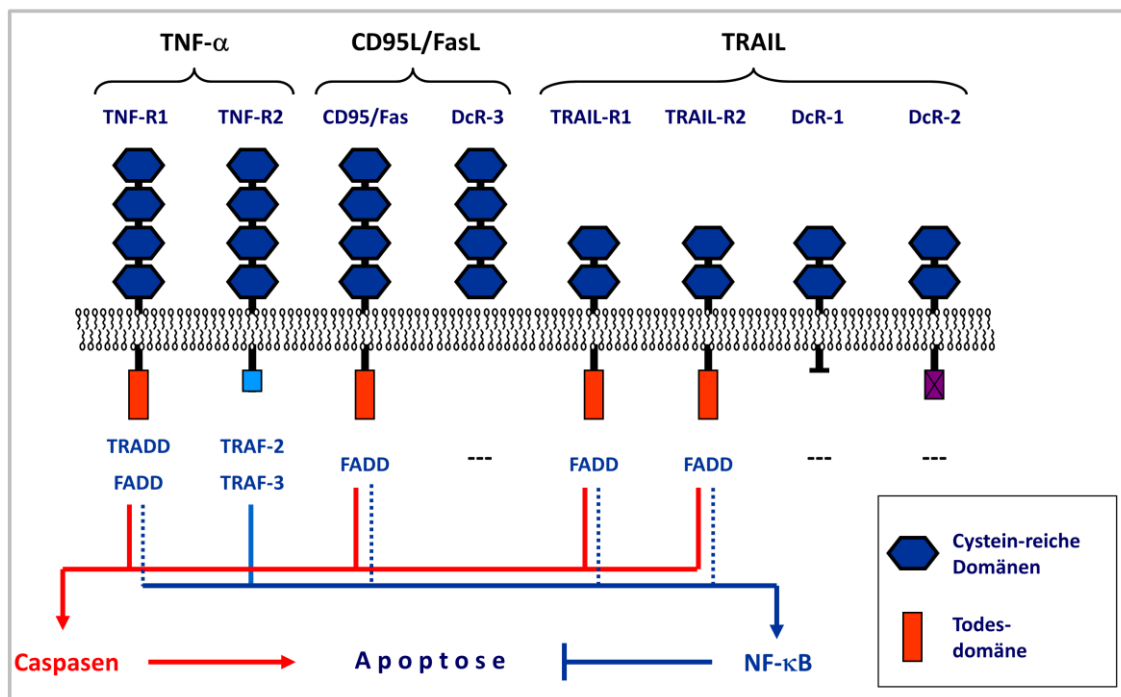


Abbildung 8

Schematische Darstellung der wichtigsten Todesliganden und der entsprechenden Todesrezeptoren sowie nachgeschalteter Signalwege (Eberle *et al*, 2007b).

In Folge der Bindung von Todesliganden kommt es zu einer Oligomerisierung der Todesrezeptoren und am zytoplasmatischen Teil der Todesrezeptoren zur Formierung des pro-apoptotischen Multiproteinkomplexes DISC. Der DISC besteht unter anderem aus Initiatorprocaspase-8 oder -10 und dem Adapterprotein FADD (*Fas-associated death domain protein*), das die Bindung zur zytoplasmatischen Todesdomäne der Todesrezeptoren vermittelt (Scott *et al*, 2009). Als Folge der Formierung des DISC kommt es zur Aktivierung der Initiatorcaspase-8 oder -10, die letztendlich über die

Aktivierung von Effektorcaspasen zur Spaltung von Todessubstraten (z. B. ICAD oder PARP) sowie zur Fragmentierung der DNS führt (Fischer *et al*, 2003). Für aktive Caspasen wurden im Verlauf der letzten Jahre eine große Zahl von möglichen Substraten berichtet. Hierzu muss jedoch gesagt werden, dass für viele dieser Substrate weder deren physiologische Rolle bekannt ist noch deren Spaltung *in vivo* nachgewiesen werden konnte (Fischer *et al*, 2003; Timmer and Salvesen, 2007; Taylor *et al*, 2008).

1.8.2 Caspasensignalkaskade

Bei Caspasen handelt es sich um eine Gruppe von Proteasen, die in verschiedenen Signalwegen von elementarer Bedeutung sind (Tabelle 2). Der Name Caspase leitet sich von ihrer Funktion als Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Protease ab. Caspasen werden als Zymogene gebildet und verfügen im Allgemeinen über einen ähnlichen strukturellen Aufbau. Sie bestehen aus einer, in ihrer Länge variierender, N-terminalen Prodomäne, gefolgt von konservierten, katalytischen Untereinheiten (Abbildung 9). Dabei scheinen die Caspase-2, -3, -6, -7, -8, -9 und -10 überwiegend in der Apoptose und die Caspase-1, -4 und -5 überwiegend in der Inflammation von Bedeutung zu sein (Tabelle 2) (Martinon and Tschopp, 2007; Pop and Salvesen, 2009). Überdies lassen sich die in der Apoptose involvierten Caspasen in Initiatorcaspasen (-8, -10, -9, -2) und in Effektorcaspasen (-3, -6, -7) unterteilen.

Tabelle 2 Übersicht der Funktionen von Caspasen in humanen Zellen (Taylor *et al*, 2008).

Caspase	8, 10, 9, 2	3, 6, 7	1, 4, 5, 12 _L	14
Funktion	Apoptose	Apoptose	Inflammation	Keratinocyten-differenzierung
	Initiatorcaspasen	Effektorcaspasen		

Im Zuge der Caspasenaktivierung spielt die direkte proteolytische Spaltung nur für Effektorcaspasen eine entscheidende Rolle. Für Initiatorcaspasen ist der aktivierende Schritt die Einlagerung in Multiproteinkomplexe wie dem DISC, dem Apoptosom, dem PIDDosom oder dem Inflammasom. Dabei lagern sich Initiatorcaspasen mit Adapterproteinen wie z. B. FADD oder Apaf-1 und weiteren Faktoren wie z. B. Cytochrom C zu diesen Multiproteinkomplexen (Csp-8, -10: DISC; Csp-9: Apoptosom; Csp-2: PIDDosom) zusammen (Abbildung 9) (Tinel and Tschopp, 2004; Bratton and Salvesen, 2010; Schroder and Tschopp, 2010).

In diesen Komplexen kommt es zur Dimerisierung der Caspasen, ausgelöst durch die räumliche Nähe, was auch als *proximity-induced dimerization* bezeichnet wird (Salvesen and Dixit, 1999; Oberst *et al*, 2010). Im Verlauf der Aktivierung von Caspasen kommt es zur Prozessierung der katalytischen Untereinheiten in eine große (A) und eine kleine (B) Untereinheit, die sich zu Dimeren in der Art ABB'A' zusammenlagern. Die großen Untereinheiten (A oder A') verfügen über Cys- und His-Aminosäurereste und vermitteln die katalytische Aktivität. Die kleinen Untereinheiten (B oder B') besitzen indes Aminosäurereste, die für die Substratbindung notwendig sind. Im Verlauf der Aktivierung kann es durch intramolekulare Prozessierung zu weiteren Maturierungsereignissen kommen (Abbildung 10). Dies führt zur Abspaltung oder Kürzung der verschiedenen Linkerregionen, was zu einer Stabilisierung der Dimerkomplexe beiträgt.

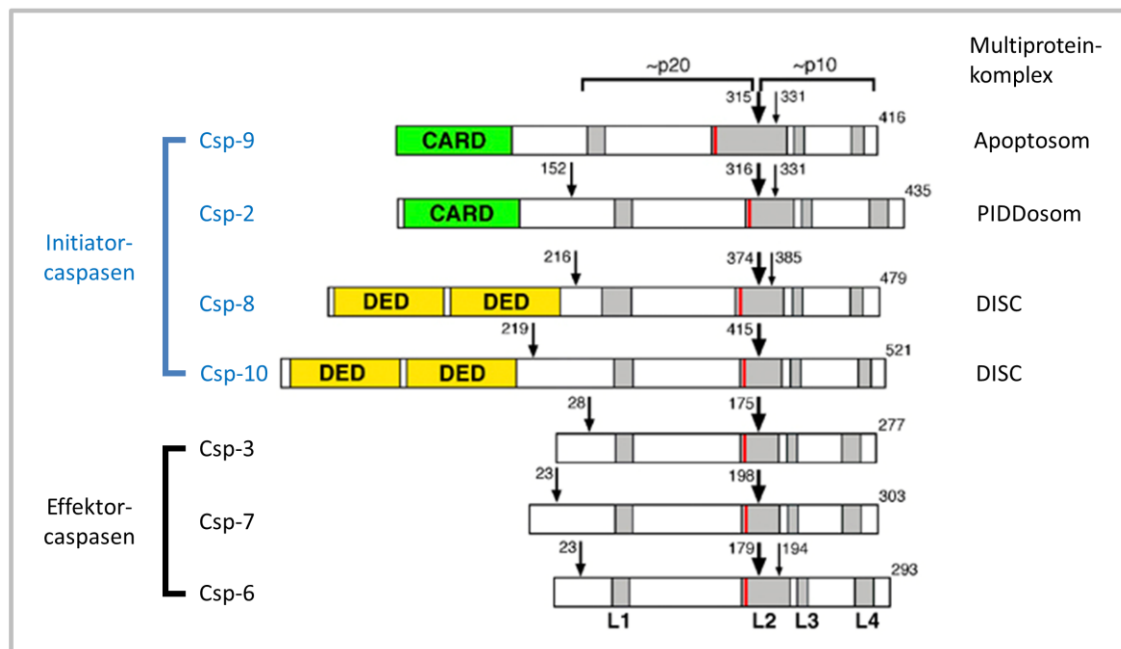


Abbildung 9

Caspasenaufbau. Position der ersten Spaltstelle, zwischen der großen (p20) und der kleinen (p10) Untereinheit, ist durch einen dicken Pfeil, die weiteren Schnittstellen durch weitere Pfeile gekennzeichnet. Die Prodomäne der Initiatorcaspasen enthält DED (*death effector domain*)- oder CARD (*caspase recruitment domain*)-Domänen. Eingezeichnet sind die Oberflächen-Loops (L1-4) sowie in Rot die katalytisch aktiven Cysteinreste (Bao and Shi, 2007).

Drei Ebenen der Regulation von aktiven Caspasen sind beschrieben: die direkte Caspaseninhibition, die Caspasendegradation oder die Caspaseninhibition durch Decoy-Inhibitoren. Eine direkte Caspaseninhibition kann beispielsweise durch die Bindung von nicht spaltbaren Substraten an die katalytisch aktiven Stellen erfolgen. Beispiele hierfür stellen die viralen Proteine CrmA (*cytokine response modifier A*) oder p35 dar (Stennicke

et al, 2002). Dabei handelt es sich um eine eher unspezifische Caspaseninhibition. Ein etwas spezifischerer Ansatz der direkten Caspaseninhibition wird durch das zur IAP-Proteinfamilie gehörende Protein XIAP repräsentiert. Dieses IAP kann über die BIR 3-Domäne (*baculovirus IAP repeat*) Caspase-9 bzw. über die BIR 2-Domäne aktive Effektorcaspasen blockieren (Eckelman *et al*, 2008).

Eine weitere Möglichkeit zur Regulation von Caspasen stellt ein erhöhter proteosomaler Abbau von aktiven Caspasen dar. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass aktive Caspasen im Vergleich zu ihrer inaktiven Zymogenform einen erhöhten Umsatz haben. Hierbei scheinen auch IAPs, die mit Ubiquitinierungsereignissen assoziierte RING (*really interesting new gene*)- und UBA (*ubiquitin-associated*)-Domänen besitzen, eine Rolle zu spielen (Gyrd-Hansen *et al*, 2008).

Ein Beispiel für einen Caspasen-Inhibitor, der auf Grund seiner strukturellen Ähnlichkeit zur Blockierung von Initiatorcaspasen führt, ist die Pseudocaspase c-FLIP (*cellular FLICE-inhibitory protein*). Diese kann sich ebenfalls in den DISC einlagern und so zur Verdrängung von Procaspase-8 oder -10 führen (Shirley and Micheau, 2010). Daher ist eigentlich die Bezeichnung Caspasen-Inhibitor irreführend. Vielmehr sollte von einem Aktivierungsblockierer geredet werden.

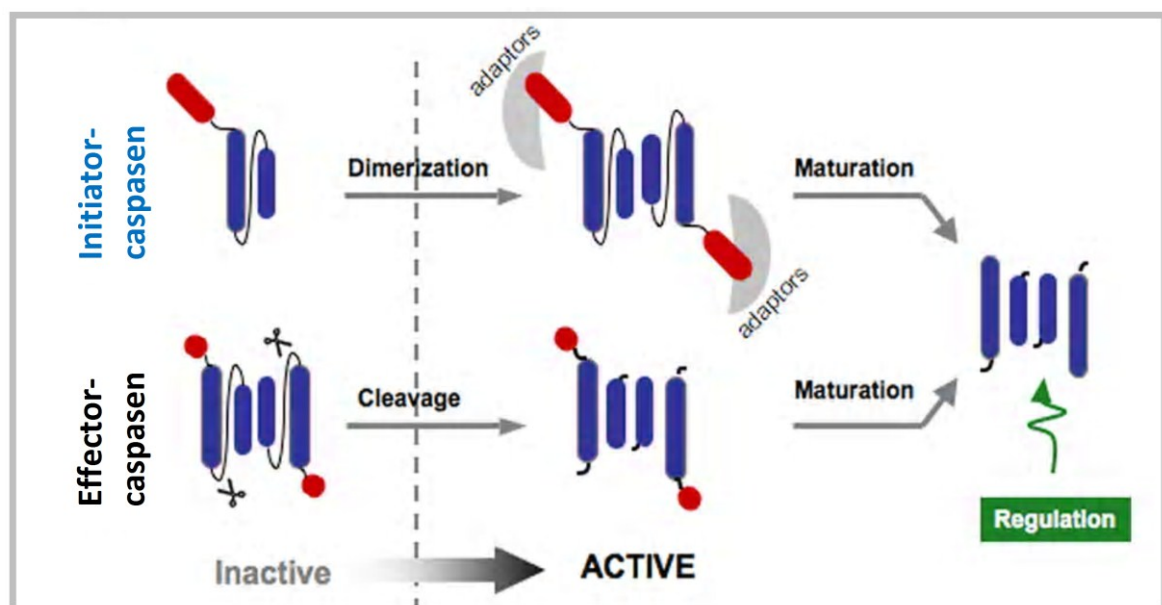


Abbildung 10

Prozessierung von Initiator- und Effektorcaspasen (Pop and Salvesen, 2009).

1.8.3 Initiatorcaspasen-Inhibitor – c-FLIP

Bei dem Caspasen-Inhibitor FLIP handelt es sich um einen wichtigen Inhibitor der Todesliganden-induzierten Apoptose. Im Rahmen der Suche nach Caspasenbindungspartnern, also Proteinen, die über eine DED-Domäne (*death effector domain*) verfügen, wurde zunächst das virale v-FLIP identifiziert (Thome *et al*, 1997). Kurze Zeit danach zeigte sich, dass auch in Säugetierzellen ein homologes Protein existiert – c-FLIP (Abbildung 11). Zurzeit sind 11 Spleißvarianten auf mRNA-Ebene beschrieben, von denen drei als Protein nachweisbar sind: das 55 kDa große c-FLIP_L (*long*), das 26 kDa große c-FLIP_S (*short*) und das in Raji-Zellen identifizierte 24 kDa große c-FLIP_R (Irmeler *et al*, 1997; Djerbi *et al*, 1999). Im Allgemeinen ist die Struktur von c-FLIP einer Initiatorcaspase recht ähnlich und wird daher auch als Pseudocaspase bezeichnet. Allen drei FLIP-Isoformen gemeinsam ist die DED-Domäne.

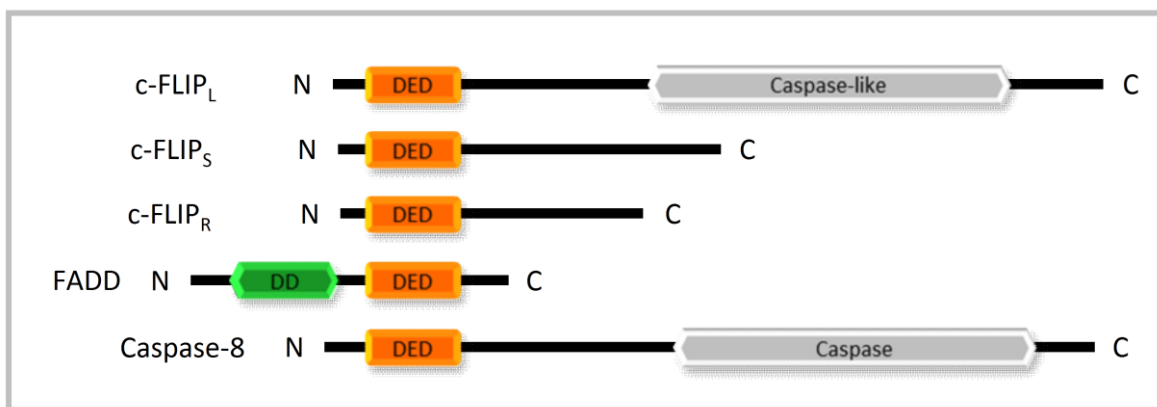


Abbildung 11

Schematische Darstellung des Aufbaus verschiedener DED (*death effector domain*)-Proteine (Budd *et al*, 2006).

Von allen Isoformen verfügt jedoch nur c-FLIP_L über einen Caspasen-ähnlichen C-terminalen Teil, der allerdings nicht die für die enzymatische Aktivität wichtigen Aminosäuremotive Gln-Ala-Cys-X-Gly und His-Gly besitzt (Cohen, 1997). Die Entstehung von FLIP wird mit der Genduplikation einer Initiatorcaspase erklärt, eine Annahme, die auch durch die räumliche Nähe dieser Gene auf dem Chromosom 2 unterstützt wird (Djerbi *et al*, 1999). Vergleichbar zu v-FLIP sind auch c-FLIP_S, c-FLIP_R und c-FLIP_L in der Blockierung von Todesliganden-induzierter Apoptose involviert. Eine ausschließliche Apoptoseblockierung zeigt sich dabei nur für c-FLIP_S und c-FLIP_R (Shirley and Micheau, 2010).

Für c-FLIP_L konnte über die Identifikation von Bindungspartnern ein Zusammenhang zum NF-κB-Signalweg nachgewiesen werden (Tabelle 3) (Thome and Tschopp, 2001). Hierbei spielen möglicherweise FLIP_L-Spaltprodukte, die auftreten, wenn c-FLIP_L durch Caspase-8 prozessiert wird, eine Rolle. Dimere aus Caspase-8 und der prozessierten p43-c-FLIP-Form zeigen eine erhöhte Affinität zur Anlagerung von TRAF-2 (*TNFR-associated factor 2*) und RIP-1 (*receptor-interacting protein 1*), was im Zusammenhang zur Aktivierung von NF-κB steht (Kataoka and Tschopp, 2004; Dohrman *et al*, 2005).

Auch zeigte sich, dass die Überexpression von c-FLIP_L nicht per se zu einer Blockierung von Apoptose führt, sondern im Gegenteil, caspasenabhängige Apoptose verstärken kann. Eine mögliche Erklärung könnte in dem Heterodimer aus c-FLIP und Caspase-8 liegen, in dem der enzymatisch aktive *Loop* von Caspase-8 durch c-FLIP stabilisiert wird (Micheau *et al*, 2002; Yu *et al*, 2009).

Tabelle 3 Bindungspartner von c-FLIP-Isoformen (verändert nach (Thome and Tschopp, 2001)).

Protein	c-FLIP _s	c-FLIP _L
FADD	+	+
Caspase-8	+	+
Caspase-10	+	+
Caspase-3	+	+
Bcl-x _L	ND	+
TRAF1	-	+
TRAF2	-	+
TRAF3	ND	+
RIP	±	+
RIP-2	-	+
NIK	ND	+
IKK-2	ND	ND
Raf-1	ND	+
+ Bindung, - keine Bindung, ± schwache Bindung, ND: not determined		

Im Allgemeinen spielen DED-Proteine wie c-FLIP, FADD oder auch Caspase-8 eine wichtige Rolle in der Differenzierung und in der Aktivierung von T-Zellen (Zhang and He, 2005; Pellegrini *et al*, 2005). Interessanterweise ist der Phänotyp von c-FLIP-defizienten T-Zellen dem von Caspase-defizienten ähnlich (Chun *et al*, 2002) und ein Verlust von c-FLIP in transgenen Mäusen zeigte sich bereits nach 10,5 Tagen als letal (Yeh *et al*, 2000).

Der Einfluss auf die *Life-and-Death-Decision* einer Zelle wird daher auch vom Verhältnis aller c-FLIP-Isoformen zu anderen pro-apoptotischen Mediatoren wie FADD oder Initiatorcaspase-8 bestimmt (Fricker *et al*, 2010). C-FLIP ist überdies auf Grund seiner pro-proliferativen und anti-apoptotischen Eigenschaften als ein therapeutisch relevantes Zielprotein anerkannt (Safa *et al*, 2008). Ebenso ist für verschiedene Tumorzellen eine dysregulierte c-FLIP-Expression beschrieben (Bagnoli *et al*, 2010).

1.8.4 Effektorcaspasen-Inhibitoren – IAPs

Die zweite wichtige Gruppe von Caspaseninhibitoren stellt die IAP-Proteinfamilie dar. Das charakterisierende Merkmal der IAPs sind die BIR-Domänen. Dabei handelt es sich um Zinkbindungsstellen, die 70 Aminosäuren umfassen und für die Proteinwechselwirkungen wichtig sind (Birnbaum *et al*, 1994; Hinds *et al*, 1999). Im Allgemeinen kann man zwei Gruppen von BIR-Domänen unterscheiden, Typ I (BIR 1) und Typ II (BIR 2 und BIR 3), die jeweils über spezifische Bindungseigenschaften verfügen (Abbildung 12). Ein bekanntes Bindungsmotiv für Typ II BIR-Domänen stellt dabei das IBM (*IAP-binding motif*) dar. Die Unterscheidung von Typ I und Typ II BIR-Domäne hängt auch mit der Ab- bzw. Anwesenheit einer sogenannten „*deep-peptide binding groove*“ zusammen (Rothe *et al*, 1995; Uren *et al*, 1996; Lu *et al*, 2007). Die in Säugetierzellen vorkommenden IAPs, wie zum Beispiel XIAP, cIAP-1, cIAP-2 oder Survivin, haben bis zu drei dieser Domänen im N-terminalen Bereich. Neben diesen Domänen kann sich C-terminal zusätzlich eine RING-Finger-Domäne, die über E3-Ubiquitinligase-Aktivität verfügt (Yang and Li, 2000) bzw. eine UBA-Domäne befinden, die für die Interaktion mit ubiquitierten Proteinen notwendig ist (Gyrd-Hansen *et al*, 2008; Blankenship *et al*, 2009). Schließlich verfügen cIAP-1 und -2 zusätzlich über eine CARD-Domäne (*caspase recruiting domain*), deren genaue Funktion noch unklar ist.

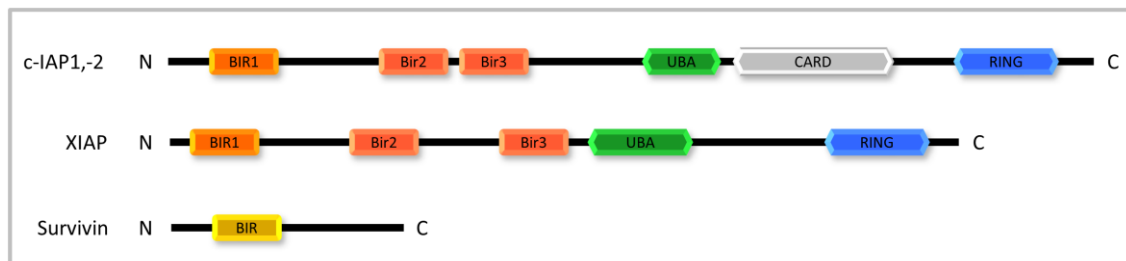


Abbildung 12

Schematische Darstellung verschiedener Mitglieder der IAP (*inhibitors of apoptosis proteins*)-Proteinfamilie (Gyrd-Hansen and Meier, 2010; Altieri, 2010).

XIAP ist in der Lage, durch direkte Bindung Effektorcaspasen sowie die Initiatorcaspase-9 zu blockieren (Bratton and Salvesen, 2010). Dabei wird das Bindungsmotiv, das von XIAP über die BIR 2-Domäne sowie der Linkerregion dazwischen erkannt wird, erst in aktiven Effektorcaspasen zugänglich. Die Inhibition von Initiatorcaspase-9 wird im Unterschied dazu durch die BIR 3-Domäne vermittelt, die zu einer Blockierung der für die Aktivität notwendigen Konformationsänderung führt (Shiozaki *et al*, 2003).

Generell werden IAPs mit der Regulation der caspasenabhängigen Apoptose in Verbindung gebracht, jedoch spielen sie auch in verschiedenen anderen Signalwegen eine wichtige Rolle, zum Beispiel in der Ubiquitin-abhängigen Regulation der Aktivierung von NF- κ B (Galban *et al*, 2008; Galban and Duckett, 2010). Eine Involvierung der IAPs wurde überdies in der Metastasierung, der MAP-Kinase-Signalgebung, der Zellteilung sowie der Mitose berichtet (Dogan *et al*, 2008; Mehrotra *et al*, 2010). Die Expression von Mitgliedern der IAP-Proteinfamilie sind in verschiedenen Tumoren mit Chemoresistenz, Progression sowie einer verschlechterten Prognose assoziiert (LaCasse *et al*, 2008), was zur Entwicklung von sogenannten SMAC-Mimetika geführt hat. Dabei handelt sich um Peptide, die dem physiologischen IAP-Inhibitor SMAC/DIABLO ähneln. Der mögliche therapeutische Nutzen dieser Peptide wird zurzeit in verschiedenen klinischen Studien evaluiert. Obwohl in normalen Geweben die Inaktivierung von IAPs nicht nachteilig zu sein scheint, gibt es Hinweise darauf, dass die Entstehung von bestimmten Arten von Krebs mit dem Verlust von IAPs assoziiert sein könnte (Wright and Duckett, 2005; Jost *et al*, 2009; Gyrd-Hansen and Meier, 2010).

1.8.5 Intrinsischer (Mitochondrialer) Apoptosesignalweg

Im intrinsischen Apoptosesignalweg sind die Mitochondrien von zentraler Bedeutung. Die Aktivierung dieses Apoptosesignalweges führt zur Freisetzung von pro-apoptotischen, mitochondrialen Faktoren (Tait and Green, 2010). Diese Faktoren können zur Ausbildung des Apoptosoms führen, was die Aktivierung der Caspasensignalkaskade zur Folge hat (Hengartner, 2000; Fulda and Debatin, 2006; Bratton and Salvesen, 2010). Für T-Zellen, als sogenannte Typ I-Zellen (Barnhart *et al*, 2003), ist zwar der extrinsische, Todesliganden-vermittelte Signalweg von größerer Bedeutung, jedoch ist durch die Beteiligung des mitochondrialen Signalweges eine Verstärkung von extrinsischen Apoptosesignalen möglich. Dies wird durch die Spaltung des Bcl-2-Proteins Bid zu tBid (*truncated* Bid) durch aktivierte Initiatorcaspase-8 realisiert. Die Translokation von tBid in

die Mitochondrienmembran sowie die Bindung an Bax führt dann zur Aktivierung des mitochondrialen Signalweges (Li *et al*, 1998).

Generell wird die Permeabilität der Mitochondrien und damit die Aktivierung des Apoptosesignalweges durch die Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie reguliert (Abbildung 13) (Reed, 2008). Im Verlauf der Aktivierung des intrinsischen Signalweges stellt die Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) ein reversibles Ereignis dar. Hingegen ist die Freisetzung von Cytochrom C, auch auf Grund der dafür notwendigen Porenbildung, ein irreversibler Schritt (Tait and Green, 2010).

Mitochondrien sind in erster Linie die Energielieferanten der Zelle. Hier wird ATP über die oxidative Phosphorylierung generiert, wodurch Mitochondrien auch eine Quelle von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sind. Im Zuge der Ausbildung von Poren in gestörten oder beschädigten Mitochondrien kann es zur Freisetzung von ROS kommen. Umgekehrt kann die Freisetzung von ROS aus anderen Quellen zur Permeabilisierung der Mitochondrien führen und so zur Aktivierung des intrinsischen Signalweges beitragen (Orrenius *et al*, 2007). Generell ist der intrinsische, mitochondriale Apoptosesignalweg auch für Therapiestrategien sowie für die Apoptoseinduktion durch intrazelluläre Signale von großer Bedeutung (Abbildung 13) (Gogvadze *et al*, 2009; Gupta *et al*, 2009).

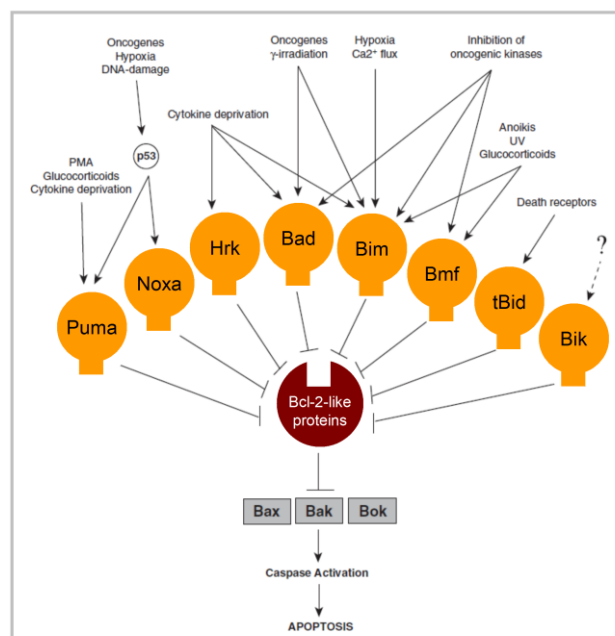


Abbildung 13

Aktivierung des mitochondrialen Signalweges durch pro- und anti-apoptotische Bcl-2-Proteine. Erläuterungen siehe Abschnitt 1.8.5 (Kelly and Strasser, 2011).

1.8.6 Apoptoseregulation durch die Bcl-2-Proteinfamilie

Nach der Erstbeschreibung von Bcl-2 (*B cell lymphoma 2*) (Tsujimoto *et al*, 1984) konnten eine Reihe von Proteinen auf Grund von strukturell ähnlichen Bereichen, den sogenannten BH (*Bcl-2 homology*)-Domänen sowie auf Grund ihrer Wechselwirkung mit Bcl-2 identifiziert und klassifiziert werden. Zusammen bilden sie die Bcl-2-Proteinfamilie. Proteine der Bcl-2-Familie besitzen bis zu vier konservierte BH-Domänen (BH1-BH4), über die Protein-Protein-Interaktionen stattfinden können (Chipuk *et al*, 2010). Generell kann die Bcl-2-Proteinfamilie in zwei Gruppen unterteilt werden: in anti-apoptotische Bcl-2-Proteine wie Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1 (*myeloid cell leukemia sequence 1*) und A1/Bfl-1 sowie in pro-apoptotische Bcl-2-Proteine. Diese pro-apoptotische Gruppe lässt sich des Weiteren in eine BH-Multidomänengruppe mit Bax (*B cell lymphoma 2-associated X protein*), Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*), Bcl-x_S und Bcl-x_{AK} sowie in eine BH-3-only-Gruppe mit Bid, Bik/Nbk, Bad, Noxa und Puma aufteilen (Abbildung 14) (Hossini and Eberle, 2008).

Eine Interaktion von pro- und anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen erfolgt über die Bindung der exponierten BH3-Domäne der pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine an eine als hydrophobe Tasche bezeichnete Struktur, die sich aus einer Reihe von BH-Domänen der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteinen formt. Dabei kann die BH4-Domäne zu einer Stabilisierung dieser Wechselwirkung beitragen (Hossini and Eberle, 2008). Eine solche Bindung führt zur Blockierung der pro-apoptotischen Funktion der entsprechenden Bcl-2-Proteine. Eine vergleichbare Interaktion zwischen pro-apoptotischen Bcl-2-Proteinen führt hingegen zu einer Verstärkung der Wirkung (Daniel *et al*, 2003).

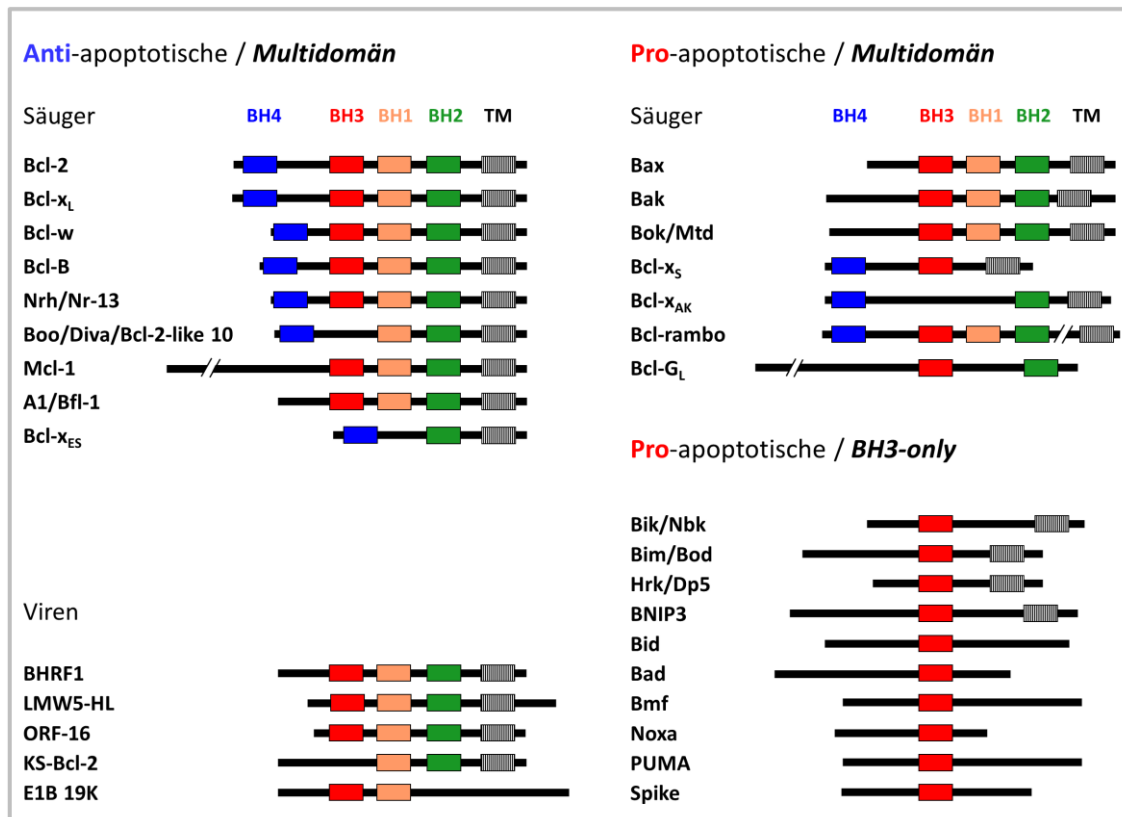


Abbildung 14

Schematische Darstellung der Struktur von anti- und pro-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie. Dargestellt sind die BH-Domänen (BH1-4) sowie die Transmembrandomäne (TM) (Eberle *et al*, 2007b).

Die Regulation des intrinsischen Apoptosesignalweges basiert im Grunde auf der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Membranintegrität durch die anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine. Im Allgemeinen sind die Bcl-2-Proteine an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert, beziehungsweise liegen inaktiviert im Zytoplasma vor. Kommt es durch pro-apoptotische Stimuli zu einem Übergewicht an eingelagerten pro-apoptotischen Bcl-2-Proteinen und damit zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (*mitochondrial outer membrane permeabilisation* – MOMP), führt dies zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) und zur Freisetzung von mitochondrialen Faktoren wie Cytochrom C, AIF, Endonuklease G, SMAC/DIABLO und HtrA2/Omi (Chipuk and Green, 2008; Chipuk *et al*, 2010). Diese Faktoren führen im Zytoplasma zur Aktivierung von caspasenabhängigen Apoptosesignalwegen, können aber auch zum Teil unabhängig von Caspasen zu DNS-Fragmentierung führen.

1.9 Alternative Zelltodmechanismen

Neben Apoptose und Nekrose wurden weitere alternative Zelltodmechanismen anhand von morphologischen Kriterien identifiziert (Galluzzi *et al*, 2009; Kroemer *et al*, 2009). Dabei zeigte sich, dass die verschiedenen Signalwege nicht separat voneinander existieren; sie sind vielmehr miteinander verbunden und beeinflussen sich gegenseitig. In diesem Zusammenhang hat das *Nomenclature Committee on Cell Death* einheitliche Kriterien für die Beschreibung von Zelltod vorgeschlagen, die zu einer Unterscheidung von vier typischen (Apoptose, Nekrose, Autophagie und *Cornification*) und verschiedenen untypischen Zelltodmechanismen führte (Mitotische Katastrophe, Anoikis, Exzitotoxizität, Wallerianische Degeneration, Paraptose, Pyroptose, Pyronekrose und Entose) (Kroemer *et al*, 2009). In den meisten dieser Zelltodmechanismen sind jedoch die genauen molekularen Mechanismen noch weitgehend unverstanden (Zhivotovsky and Orrenius, 2010).

Autophagie wird oft als *programmed cell death type II* bezeichnet, stellt jedoch im Vergleich zur Apoptose (*programmed cell death*) und Nekroptose (*programmed necrosis*) in erster Linie einen Überlebenssignalweg dar, der einen Zeitraum mit Nährstoffmangel überbrücken soll. Kommt es allerdings nicht zu einer Verbesserung der Nährstoffsituation, kommt es zum Absterben der Zelle (Kroemer and Jaattela, 2005; Mizushima *et al*, 2008). *Cornification* ist ebenfalls eine Art programmierter Zelltod, der in der Epidermis als terminale Differenzierung der Keratinozyten (Lippens *et al*, 2009) und bei der Reifung von roten Blutzellen oder im Linsenepithelium nachgewiesen werden konnte. Obwohl morphologisch ähnlich, bestehen zum Teil große Unterschiede in den jeweils beteiligten biochemischen Prozessen.

Ein weiteres Kriterium, durch welches sich alternative Apoptosesignalwege charakterisieren lassen, ist die Aktivierung der Caspasensignalkaskade. Hierbei können auch alternative Proteasen wie Cathepsine von Bedeutung sein. Neben den in Lysosomen lokalisierten Cathepsinen werden weitere Faktoren wie ROS/RNS oder mitochondriale Faktoren wie AIF als Ursache für Caspasen-unabhängige Apoptose diskutiert (Broker *et al*, 2005; Tait and Green, 2008; Franke *et al*, 2010).

In aktuellen Modellen zur Apoptoseregulation werden die Caspasen-unabhängigen Formen des programmierten Zelltodes sowie die offensichtliche Redundanz der verschiedenen Signalwege als ein Schutzmechanismus diskutiert, der einem Ausfall der klassischen caspasenabhängigen Apoptose entgegenwirken soll (Lockshin and Zakeri, 2004; Golstein and Kroemer, 2005).

1.10 Fragestellung der Arbeit

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte die Apoptoseregulation in kutanen T-Zell-Lymphomen untersucht und neue therapeutische Strategien evaluiert werden. Apoptosesignalwege sind wichtig in der Ontogenese und Zellhomöostase von mehrzelligen Organismen und Störungen in Apoptosesignalwegen sind entscheidend an der Entstehung von Krankheiten wie Krebs beteiligt. Neben apoptoseinduzierenden Mediatoren sind Apoptoseinhibitoren Teil der physiologischen Regulation der Apoptose.

In den Untersuchungen sollte dabei die Todesliganden-vermittelte Apoptose im Mittelpunkt stehen. Zunächst war der Vergleich von kutanen T-Zell-Lymphom-Zelllinien mit systemischen T-Zell-Lymphom-Zelllinien hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber Todesliganden-induzierter Apoptose geplant. Durch die Verwendung einer großen Anzahl kutaner T-Zell-Zelllinien sollte ein möglichst allgemein gültiges Bild der Apoptosensitivität zu Stande kommen. Mit Hilfe des Nachweises bekannter kritischer Apoptosemediatoren sollten Unterschiede zwischen kutanen und systemischen T-Zell-Zelllinien identifiziert werden.

Des Weiteren sollte der Einfluss der CD30-Signalgebung in CD30-positiven Lymphomzellen auf die Apoptoseregulation geklärt werden. Dabei war die Rolle der NF- κ B-Signalwege und deren Zielproteine von besonderem Interesse. Im Allgemeinen war die Korrelation der gefundenen *in vitro*-Befunde mit der *in vivo*-Situation durch die Einbeziehung von CTCL-Patientenbiopsien angestrebt. Hierfür war geplant, die identifizierten, kritischen Apoptosemediatoren auch in Patientenproben nachzuweisen.

Letztendlich sollten die gewonnenen Erkenntnisse der Dysregulationen der Apoptosesignalwege in CTCL-Zellen zu einer verbesserten CTCL-Therapiestrategie führen. In diesem Zusammenhang war die Evaluierung von nicht-steroidalen anti-inflammatorischen Substanzen (NSAIDs) hinsichtlich ihrer anti-tumoralen Aktivität sowohl in CTCL-Zelllinien (*in vitro*) als auch in isolierten Tumor-T-Zellen (*ex vivo*) von CTCL-Patienten geplant.

2 Ergebnisse

2.1 Apoptoseresistenz von CTCL-Zelllinien

Zur Aufklärung der Apoptoseregulation in kutanen T-Zell-Lymphom (CTCL)-Zellen wurden vier kutane MF/SzS-Zelllinien (HH, HuT-78, MyLa und SeAx) sowie vier kutane CD30-positive ALCL-Zelllinien (JK, Mac-1, Mac-2A, und Mac-2B) hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber Todesliganden-induzierter Apoptose untersucht. Im Vergleich dazu wurde die Apoptosesensitivität von vier systemischen T-ALL-Zelllinien (Jurkat, MOLT-4, CCRF-CEM und Karpas-45) bestimmt. Alle Zelllinien wurden mit den Todesliganden TRAIL, TNF- α sowie dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH-11 für 16 h behandelt und die Apoptoseinduktion mittels DNS-Fragmentierungs-ELISA und Propidiumjodid (PI) DNS-Färbung quantifiziert. Parallel dazu wurde die Zytotoxizität anhand der LDH-Freisetzung bestimmt.

Die Stimulation des Todesrezeptors CD95 mit CH-11 (100 ng/ml) induzierte in allen vier systemischen sowie in sieben von acht kutanen Lymphom-Zelllinien Apoptose. Nur eine kutane Zelllinie, SeAx, zeigte sich gegenüber CD95-Stimulation als resistent (Abbildung 15 A). Die Aktivierung von CD95 (CH-11, 100 ng/ml, 8h) führte in cALCL-Zellen zu 10-30% apoptotischen, hypodiploiden Sub-G1-Zellpopulationen (Abbildung 15 B und C).

Im Gegensatz zu den systemischen Lymphom-Zelllinien, die auf TRAIL- (20 ng/ml) und TNF- α - (10 ng/ml) Stimulation mit einer signifikanten Apoptoseinduktion reagierten, zeigten sich alle kutanen Lymphom-Zelllinien als resistent gegenüber TRAIL- und TNF- α -induzierter Apoptose (Abbildung 15A). Abhängig von der Stimulationsdauer von CD95 durch CH-11 zeigte sich eine geringe Zytotoxizität, die als sekundäres Ereignis zu werten ist, da sie zu früheren Zeitpunkten bei ähnlicher Apoptoseinduktion nicht nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). Generell konnte keine signifikant erhöhte Zytotoxizität durch TRAIL und TNF- α nachgewiesen werden. Insgesamt zeigte sich damit in allen CTCL-Zelllinien eine ausgeprägte Apoptoseresistenz gegenüber TRAIL und TNF- α .

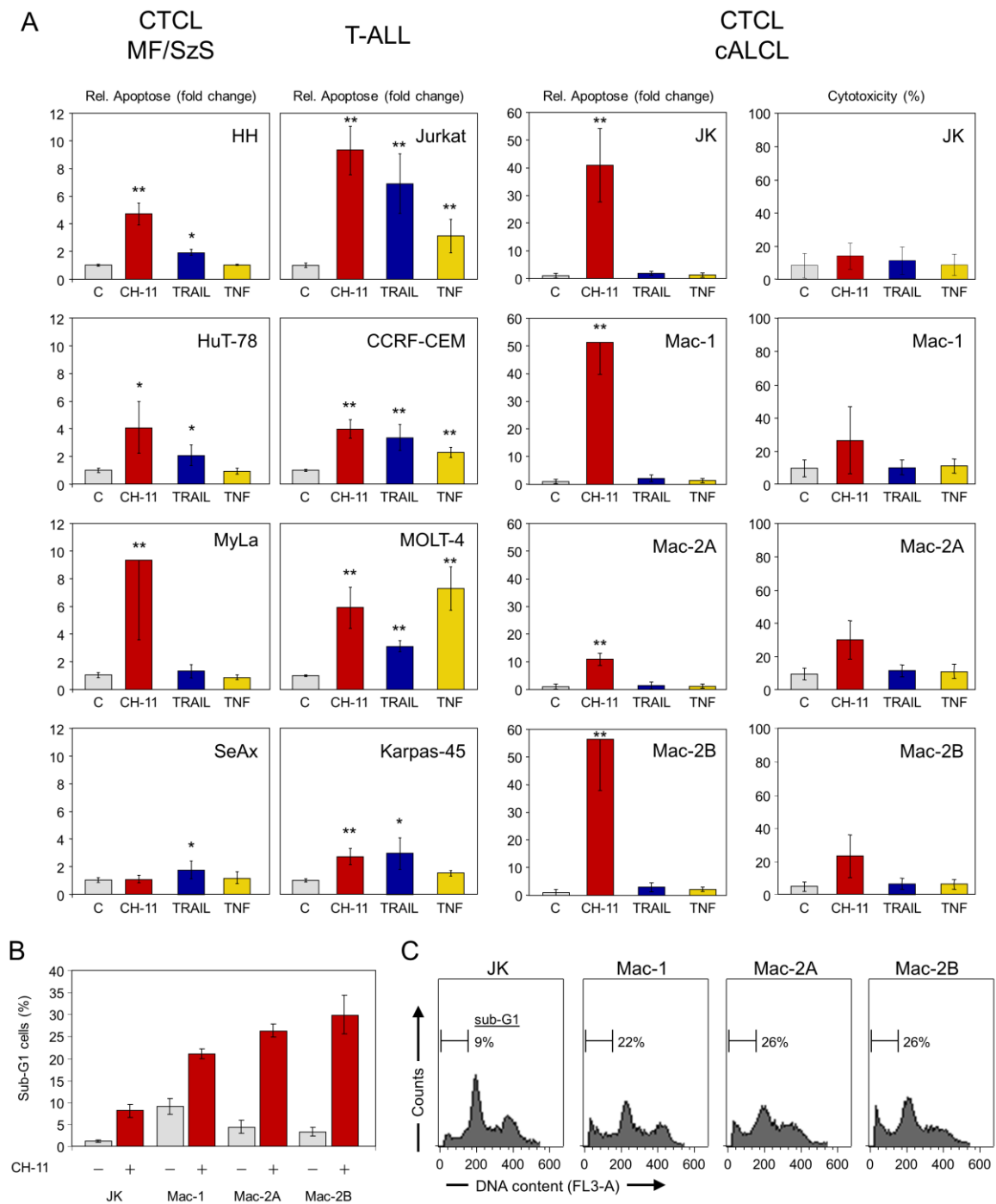


Abbildung 15 Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abbildung 15 Verminderte Sensitivität von CTCL-Zelllinien gegenüber Todesliganden-vermittelter Apoptose.

(A) Acht kutane CTCL-Zelllinien, vier MF/SzS (HH, HuT-78, MyLa und SeAx)- und vier CD30⁺ cALCL (JK, Mac-1, Mac-2A und Mac-2B)-Zelllinien, sowie als Kontrollen vier systemische T-ALL-Zelllinien (Jurkat, CCRF-CEM, MOLT-4 und Karpas-45) wurden für 16 Stunden mit den Todesliganden TNF- α (10 ng/ml), TRAIL (20 ng/ml) sowie dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH-11 (100 ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde die DNS-Fragmentierung als Maß für die Apoptoseinduktion bestimmt und als relative Apoptose dargestellt. Dafür wurden die Werte der behandelten Proben auf die jeweiligen unbehandelten Kontrollen (graue Balken, C = 1) bezogen. Die Bestimmung der Zytotoxizität erfolgte durch den Nachweis von LDH im Zellkulturüberstand. Dargestellt ist exemplarisch die LDH-Freisetzung von cALCL-Zelllinien in Prozent; hierfür wurden alle Proben auf Triton X-100 lysierte unbehandelte Kontrollen (C = 100%) bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte mit \pm SD eines repräsentativen Experimentes, das mit Dreifachwerten durchgeführt wurde. Die Signifikanz wurde mittels Student'sche *t*-Verteilung berechnet und bei einem *p*-Wert von < 0,05 mit [*] und bei *p* < 0,01 mit [**] gekennzeichnet. (B) Vier cALCL-Zelllinien wurden mit CH-11 (100 ng/ml) für 8 Stunden inkubiert und anschließend mittels PI-Färbung die apoptotische, hypodiploide Sub-G1-Zellpopulationen quantifiziert und in Prozent dargestellt. Gezeigt sind Mittelwerte mit \pm SD eines repräsentativen Experimentes, das mit Dreifachwerten durchgeführt wurde. (C) Dargestellt sind repräsentative Histogramme von CH-11-behandelten cALCL-Zelllinien. Die apoptotische Sub-G1-Zellpopulationen sind in Prozent angegeben.

2.2 Apoptoseresistenz korreliert mit der Blockierung der Caspasensignalkaskade

Zur Aufklärung der Signalwege, die in CTCL-Zellen durch Todesliganden aktiviert werden, wurde die Prozessierung der Initiatorcaspase-8, -10, -9, der Effektorcaspase-3 sowie der Abbau von Bid untersucht. Die Prozessierung von Caspasen ist ein Zeichen für die Aktivierung der Caspasensignalkaskade und ist durch die Spaltung der Procaspasen bzw. durch das Auftreten von spezifischen Caspasenspaltprodukten gekennzeichnet. Korrespondierend mit der Sensitivität gegenüber Todesliganden-induzierter Apoptose zeigte sich die vollständige Aktivierung der Caspasensignalkaskade (Caspase-8, -10, -9, -3) in T-ALL-Zellen für TRAIL, TNF- α und CD95 (Abbildung 16 B). Eine signifikante Aktivierung der Caspasenkaskade zeigte sich für CTCL-Zelllinien (MF/SzS und cALCL), mit der Ausnahme von SeAx, ausschließlich nach CD95-Aktivierung (Abbildung 16 A und C).

Eine Spaltung von Bid war nach CD95-Stimulation in Jurkat (T-ALL) und in zwei CTCL-Zelllinien (HuT-78 und MyLa) nachweisbar. Die beiden anderen CTCL-Zelllinien zeigten entweder keine Spaltung (SeAx) oder hatten keine nachweisbare Expression von Bid (HH). Dies ist vor allem im Hinblick auf die an der Apoptoseinduktion beteiligten Apoptosesignalwege in T-ALL-Zelllinien von Bedeutung. Obwohl diese Zellen sensitiv gegenüber TRAIL und TNF- α sind, zeigten sie keine Prozessierung von Bid, was auf die überwiegende Aktivierung der extrinsischen Apoptosesignalwege hindeutet.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Caspasensignalkaskade in allen untersuchten Zelllinien prinzipiell aktivierbar ist und dass die Todesliganden in erster Linie extrinsische Apoptosesignalwege aktivieren. Überdies weisen die Daten auf eine frühe Blockierung, oberhalb der Initiatorcaspase-8, der TRAIL- und TNF- α -induzierten Apoptose in CTCL-Zellen hin.

Obwohl sich in allen apoptosesensitiven Zelllinien die Aktivierung der Initiatorcaspase-8 nachweisen ließ, zeigte sich die Prozessierung der Initiatorcaspase-10 nur in CH-11-behandelten CTCL-Zelllinien (Abbildung 16 A und C). Dabei zeigte sich die Initiatorcaspase-10 in 6 CTCL-Zelllinien (HuT-78, MyLa, JK, Mac-2A, Mac-2B) als schwach und in 2 CTCL-Zelllinien (HH und SeAx) als nicht exprimiert. Im Gegensatz dazu war, unabhängig von der starken Basalexpression und der Art der Behandlung, in keiner der T-ALL-Zelllinien eine Aktivierung der Initiatorcaspase-10 nachweisbar (Abbildung 16 B).

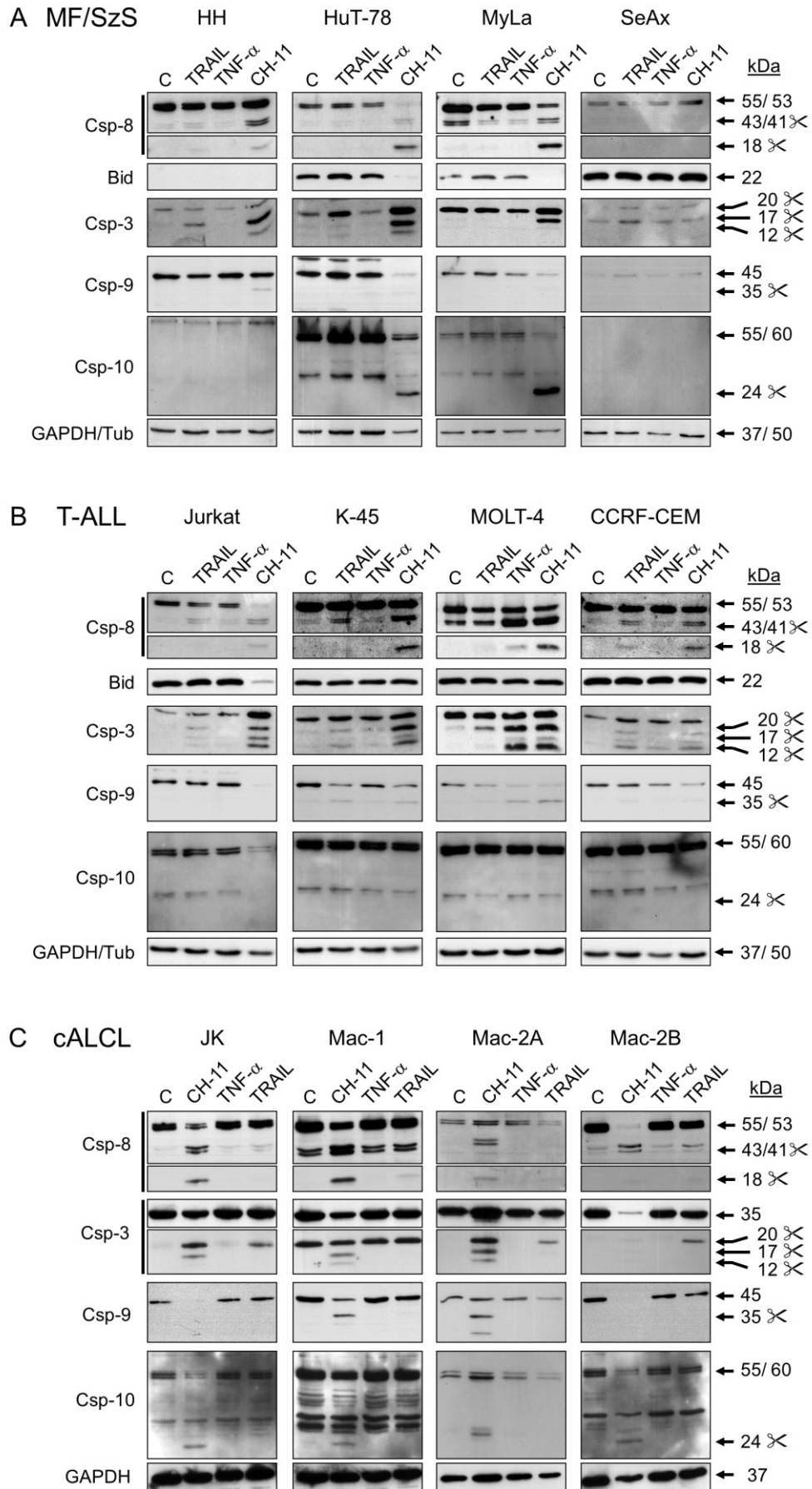


Abbildung 16 Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abbildung 16 Aktivierung der Caspasensignalkaskade in apoptosesensitiven Zelllinien.

Die Prozessierung von Caspase-8, -10, -9, -3 sowie der Abbau von Bid wurde mittels Westernblot-Analyse in (A) CTCL-, (B) T-ALL- und (C) cALCL-Zelllinien untersucht. Alle Zelllinien wurden mit TNF- α (10 ng/ml), TRAIL (20 ng/ml) und dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH-11 (100 ng/ml) für 16 Stunden inkubiert. Dargestellt ist die Caspase-8-Proform (53 und 55 kDa) sowie deren Spaltprodukte (43, 45 und 18 kDa; \gg), die Caspase-3-Proform (35 kDa) sowie deren Spaltprodukte (20, 17, 15 kDa; \gg), die Caspase-10-Proform (60 und 55 kDa) sowie deren Spaltprodukt (24 kDa), die Caspase-9-Proform (45 kDa) sowie deren Spaltprodukt (35 kDa) und die Bid-Proform (22 kDa). Die Molekulargewichte sind in kDa angegeben. Für den Nachweis der Bid-Expression sind sowohl für HH als auch für MyLa lange Expositionszeiten gezeigt. Der gleichmäßige Proteintransfer wurde mittels Ponceau-Färbung, eine gleichmäßige Proteinladung (20 μ g/Bahn) mittels verschiedener Ladekontrollen (GAPDH, α -Tubulin) bestätigt. Mindestens zwei unabhängige Experimente, mit jeweils vergleichbaren Ergebnissen, wurden durchgeführt.

2.3 Gehäufte Verlust von TNF-R1 in CTCL-Zelllinien

Eine zwingende Voraussetzung für die Aktivierbarkeit der Todesliganden-induzierten Apoptose stellt die Expression der entsprechenden Todesrezeptoren dar. Daher wurde zur Klärung der Ursachen der gefundenen Apoptoseresistenz in CTCL-Zelllinien zunächst die Oberflächenexpression der Todesrezeptoren TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5, CD95 sowie der TRAIL-Decoy-Rezeptoren (TRAIL-R3/DcR1, TRAIL-R4/DcR2) mittels Durchflußzytometrie untersucht. TRAIL-Decoy-Rezeptoren können bei entsprechender Expressionsstärke ebenfalls für die Resistenz gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose verantwortlich sein. Überdies wurde die Oberflächenexpression von CD30 in cALCL-Zellen überprüft (Abbildung 17 C). Zusätzlich wurde die Expression von TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5 und TNF-R1 mittels Westernblot-Analyse untersucht.

Die CD95-Oberflächenexpression war in 7/8 CTCL-Zellen mit der von T-ALL-Zellen vergleichbar (Abbildung 17 A-C). Nur für die CTCL-Zelllinie SeAx konnte keine signifikante Expression von CD95 nachgewiesen werden, was mit der ebenfalls in SeAx gefundenen Resistenz gegenüber CD95-induzierter Apoptose korreliert.

Eine deutliche Expression beider TRAIL-Todesrezeptoren, TRAIL-R1 (DR4) und TRAIL-R2 (DR5), zeigte sich in nahezu allen Zelllinien. Lediglich in MyLa-Zellen konnte keine DR4- sowie in MOLT-4-Zellen keine DR5-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 17 A und B). Die Expression der TRAIL-Todesrezeptoren korreliert daher nicht mit der TRAIL-Resistenz, da letztendlich alle Zelllinien mindestens einen der beiden TRAIL-Todesrezeptoren exprimieren. Auch zeigten sich diese zum Teil stärker in CTCL-Zellen exprimiert als in T-ALL-Zellen.

Untersuchungen von Gesamtproteinextrakten der CTCL- und der T-ALL-Zelllinien hinsichtlich der Expression von TRAIL-Rezeptoren (DR4 und DR5) zeigten eine

weitgehende Parallelität zu den Oberflächenexpressionsuntersuchungen (Abbildung 18 B). Mittels Westernblot-Analyse konnte für die Zelllinien HuT-78, MyLa und SeAx eine starke DR4-Expression (44 kDa) sowie für die Zelllinien HuT-78, MyLa und HH eine starke DR5-Expression (40/47 kDa) nachgewiesen werden. Unterschiede im Nachweis der Expression der Rezeptoren könnten auf einen unterschiedlichen Transport und Umsatz hindeuten.

Eine signifikante Oberflächenexpression beider TRAIL-Decoy-Rezeptoren war im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolllinien HeLa (DcR1) und SW480 (DcR2) in den meisten untersuchten Zelllinien nicht nachweisbar. Eine gewisse Expression beider Decoy-Rezeptoren war lediglich in der CTCL-Zelllinie SeAx nachweisbar, was dort unter anderem zur TRAIL-Resistenz betragen könnte (Abbildung 18 A).

Schließlich zeigte die Westernblot-Analyse der TNF-R1-Expression in den CTCL-Zellen (MF/SzS und cALCL) einen gehäuften Verlust dieses Todesrezeptors in 6/8 kutanen T-Zelllinien (HH, MyLa, SeAx, JK, Mac-2A und Mac-2B) (Abbildung 18 B und C). Im Gegensatz dazu konnte in allen T-ALL-Zelllinien eine starke Expression nachgewiesen werden (Abbildung 18 B). Daher scheint in den meisten CTCL-Zelllinien die verminderte Sensitivität bzw. die Resistenz gegenüber TNF- α -induzierter Apoptose mit dem Verlust des Todesrezeptors TNF-R1 zu korrelieren. Für die beiden CTCL-Zelllinien mit TNF-R1-Expression, HuT-78 und Mac-1, muss die Ursache der Apoptoseresistenz an einer anderen Stelle des Apoptosesignalweges liegen.

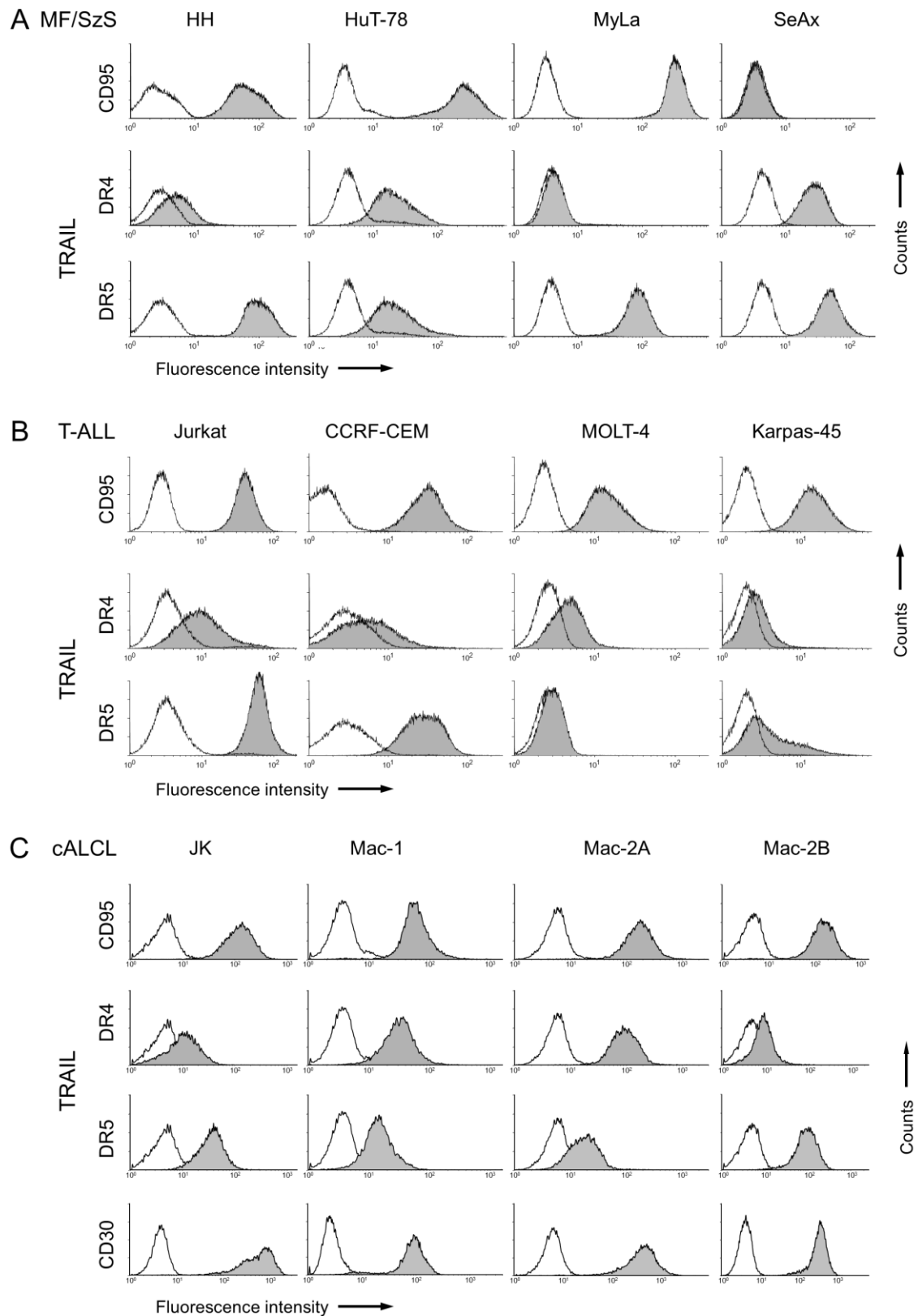
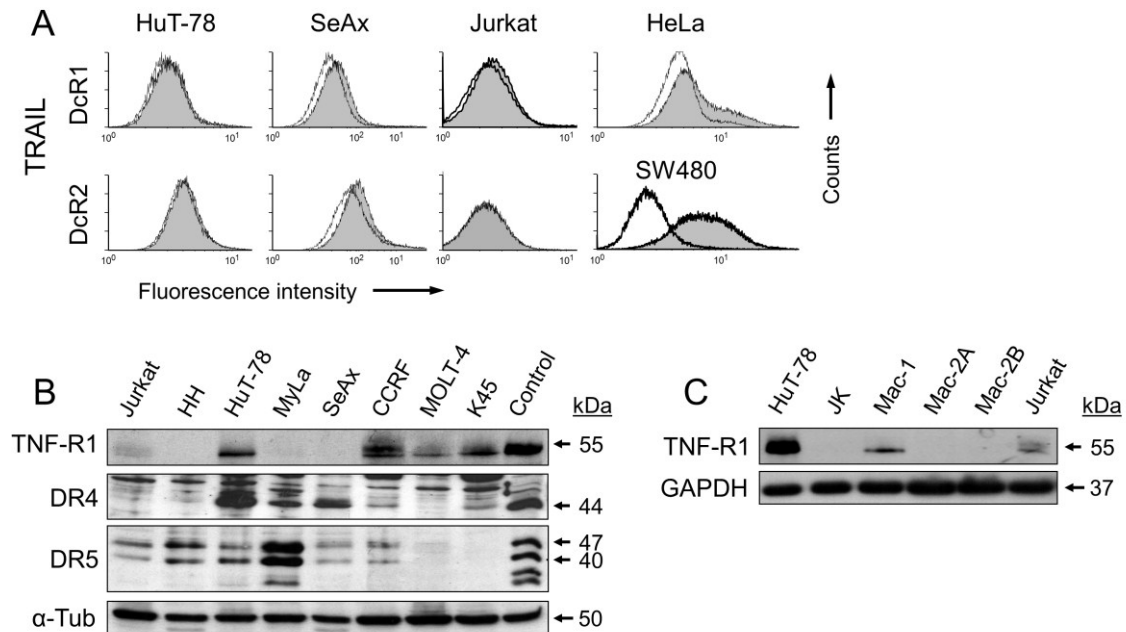


Abbildung 17 Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abbildung 17 Starke Expression von CD95 und TRAIL-Rezeptoren in CTCL-Zelllinien.

Die Oberflächenexpression von Todesrezeptoren (TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5 und CD95), TRAIL-Decoy-Rezeptoren (DcR1, DcR2) sowie von CD30 in (A) MF/SzS-, (C) cALCL- und (B) T-ALL-Zelllinien wurde mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Hierfür wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen CD95, TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5 und CD30 (gefüllte Graphen) gefärbt und zur entsprechenden Isotypkontrolle (offener Graph) verglichen. Eine Verschiebung nach rechts zeigt eine verstärkte Oberflächenexpression an. Mindestens zwei unabhängige Experimente, mit jeweils vergleichbaren Ergebnissen, wurden durchgeführt.

**Abbildung 18 Keine Expression von TRAIL-Decoy-Rezeptoren sowie Verlust von TNF-R1 in CTCL-Zelllinien.**

(A) Die Oberflächenexpression von Decoy-Rezeptoren (DcR1 und DcR2) ist exemplarisch für zwei CTCL- (HuT-78 und SeAx), für eine T-ALL- (Jurkat) sowie für zwei Kontrollzelllinien (SW480 und HeLa) dargestellt. Hierfür wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen TRAIL-R3/DcR1 und TRAIL-R4/DcR2 (gefüllte Graphen) gefärbt und zur entsprechenden Isotypkontrolle (offener Graph) verglichen. Eine Verschiebung nach rechts zeigt eine verstärkte Oberflächenexpression an. Mindestens zwei unabhängige Experimente, mit jeweils vergleichbaren Ergebnissen, wurden durchgeführt. (B, C) Die Expression der Todesrezeptoren TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5 und TNF-R1 wurden ebenfalls mittels Westernblot-Analyse in MF/SzS-, T-ALL- sowie in cALCL- (nur TNF-R1) Zelllinien untersucht. Die Molekulargewichte von TRAIL-R1/DR4 (44 kDa), TRAIL-R2/DR5 (47/40 kDa) und TNF-R1 (55 kDa) sind in kDa angegeben. Der gleichmäßige Proteintransfer wurde mittels Ponceau-Färbung sowie eine gleichmäßige Proteinladung (30 µg/Bahn) mittels GAPDH- oder α-Tubulin-Expression als Ladekontrolle bestätigt. Mindestens zwei unabhängige Experimente, mit jeweils vergleichbaren Ergebnissen, wurden durchgeführt.

2.4 Verlust von Apoptosemediatoren und starke Expression von c-FLIP

Zur Aufklärung der Ursachen, die zur Apoptoseresistenz der kutanen Zelllinien beitragen, wurden Gesamtproteinextrakte von unbehandelten Zellen auf die Basalexpression von kritischen Apoptosemediatoren mittels Westernblot-Analyse hin untersucht. Dabei stellt die Expression von Caspasen eine zwingende Voraussetzung für die Funktion der Apoptosesignalwege dar.

Eine starke Expression der Effektorcaspase-3 konnte sowohl in CTCL (MF/SzS und cALCL)- als auch in T-ALL-Zelllinien nachgewiesen werden. Die Initiatorcaspase-8 zeigte sich hingegen eher in CTCL-Zelllinien als stärker exprimiert.

Da die Expression des Adapterproteins FADD (Daten nicht gezeigt) sowie der Caspase-9 in allen untersuchten Zelllinien nachweisbar war, kann die Apoptoseresistenz nicht mit dem Verlust eines dieser Mediatoren erklärt werden. Hingegen war die Initiatorcaspase-10 in einigen CTCL-Zelllinien schwach exprimiert bzw. in HH und SeAx sogar verloren (Abbildung 16 und Abbildung 19).

Eine Untergruppe der an der Regulation des mitochondrialen Apoptosesignalweges beteiligten Bcl-2-Proteinfamilie stellen die pro-apoptotischen BH3-only Proteine dar. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist dabei das Bcl-2-Protein Bid, das die einzige bisher beschriebene Verbindung zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen Signalweg dargestellt. Bid war in allen T-ALL-Zelllinien exprimiert. Im Gegensatz dazu zeigten 4/8 CTCL-Zelllinien einen Verlust von Bid. Dies ist vor allem unter dem Gesichtspunkt interessant, da die zusätzliche Aktivierung des mitochondrialen Signalweges über die Spaltung von Bid zur Verstärkung eines extrinsischen Signales beitragen kann (Abbildung 19).

Die Aktivierung der Initiatorcaspase-8 und -10 stellt ein frühes Ereignis innerhalb der Caspasensignalkaskade dar. Deren Prozessierung und damit Aktivierung kann durch c-FLIP (*cellular FLICE-inhibitory protein*), einem kompetitiven Caspase-Inhibitor, blockiert bzw. in der Stärke moduliert werden. Überraschend war die starke und generelle Expression zweier c-FLIP-Isoformen, c-FLIP_L (*long*) und c-FLIP_S (*short*), in allen acht untersuchten kutanen Zelllinien. Die zum Vergleich untersuchten vier systemischen Zelllinien zeigten dagegen keine signifikante c-FLIP-Expression (nur Jurkat gezeigt; Abbildung 19). Dies könnte für die Apoptoseresistenz der CTCL-Zelllinien von Bedeutung sein. Die Caspasensignalkaskade verfügt im Rahmen ihrer Regulierung jedoch

noch über weitere Kontrollpunkte, an denen eine Signalweiterleitung blockiert werden kann.

Die Aktivierung der Effektorcaspasen stellt innerhalb der Caspasensignalkaskade ein spätes Ereignis dar, die hier regulierend eingreifenden Proteine gehören zur IAP-Proteinfamilie (*inhibitors of apoptosis proteins*). Im Allgemeinen zeigte sich in den CTCL-Zellen eine den T-ALL-Zellen vergleichbare Expression der wichtigsten IAPs (cIAP-1, cIAP-2, XIAP und Survivin). Dies spricht dafür, dass diese Apoptosemediatoren nicht ursächlich für die hier beschriebene Apoptoseresistenz in den CTCL-Zelllinien verantwortlich sind.

Der mitochondriale Apoptosesignalweg wird maßgeblich durch die Bcl-2-Proteinfamilie reguliert, die sowohl über pro- als auch über anti-apoptotische Mitglieder verfügt. Durch Unterschiede in den Expressionsverhältnissen zueinander können Bcl-2-Proteine zu einer veränderten Sensitivität gegenüber Todesliganden-induzierter Apoptose beitragen. Die CTCL-Zelllinien sind interessanterweise durch eine starke Expression des pro-apoptotischen Bcl-2-Proteins Bax gekennzeichnet, wobei einzelne Zelllinien auch eine starke Expression anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine wie Bcl-x_L oder Bcl-2 aufweisen. Die Expression der pro-apoptotischen BH3-only Bcl-2-Proteine Puma und Noxa, die vor allem durch DNS-Schäden aktiviert werden, sind in den CTCL-Zelllinien deutlich exprimiert (Abbildung 19). Letztendlich konnte kein Zusammenhang zwischen der Expression von Bcl-2-Proteinen und der Apoptoseresistenz nachgewiesen werden.

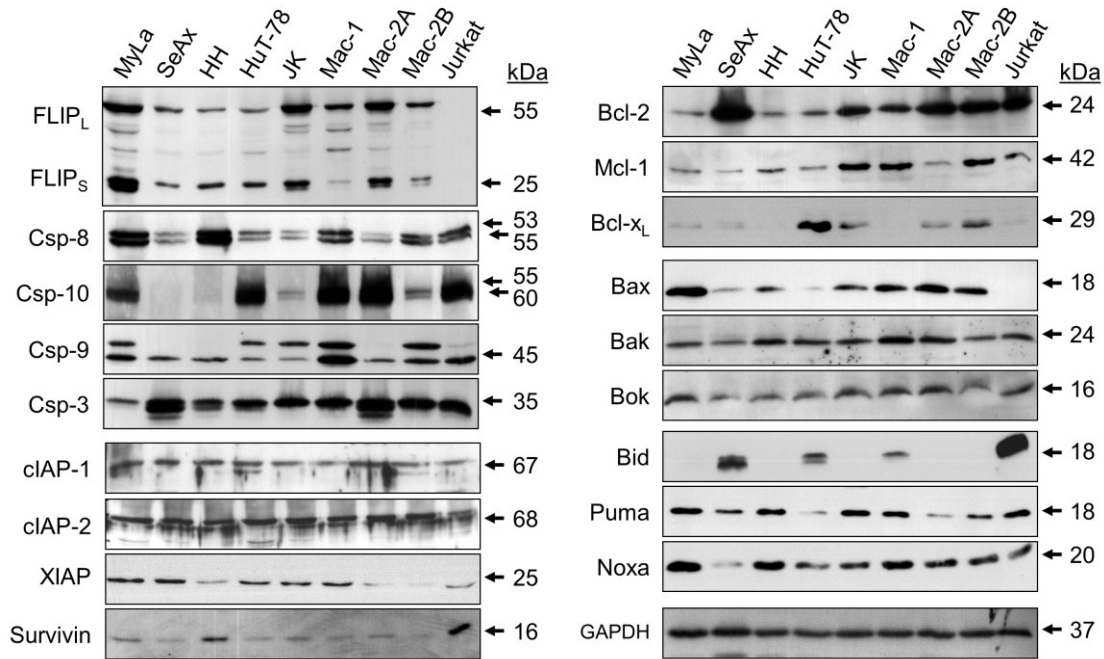


Abbildung 19 Starke Expression von c-FLIP sowie Verlust von Bid und Caspase-10 in CTCL-Zelllinien.

Die Basisexpression der Caspase-8, -10, -9, -3; der Caspaseninhibitoren c-FLIP_{LS}, cIAP1, cIAP2, XIAP, Survivin; der Bcl-2-Proteine Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, Bax, Bak, Bok sowie der BH3-only Bcl-2-Proteine Bid, Puma Noxa wurden in MF/SzS-, cALCL- und T-ALL-Zelllinien (nur Jurkat gezeigt) mittels Westernblot-Analyse untersucht. Die jeweiligen Molekulargewichte sind in kDa angegeben. Für einen Vergleich der Expressionsstärke der CTCL-Proben wurde Proteinextrakt von Jurkat als Kontrolle mit aufgetragen. Die Expression von Bid in MyLa war bei dieser Expositionszeit nicht nachweisbar, erst nach längerer Exposition der Röntgenfilme (siehe Abbildung 16 A). Für HH war auch unter diesen Bedingungen keine Bid-Expression nachweisbar. Der gleichmäßige Proteintransfer wurde mittels Ponceau-Färbung sowie eine gleichmäßige Proteinladung (25 µg/Bahn) mittels GAPDH-Expression als Ladekontrolle bestätigt. Mindestens zwei unabhängige Experimente, mit jeweils vergleichbaren Ergebnissen, wurden durchgeführt.

2.5 Korrelation zur *in vivo*-Situation in MF/SzS-Patienten

Zur Klärung der Frage, inwieweit sich die in CTCL-Zelllinien gefundenen Ergebnisse auch auf Tumorzellen von CTCL-Patienten übertragen lassen, wurden PBMCs von Sézary-Syndrom Patienten mittels Leukapherese isoliert und die Expression von c-FLIP, Caspase-10 und TNF-R1 mittels Westernblot-Analyse untersucht. Zusätzlich wurde die Expression von c-FLIP mittels immunhistochemischer Färbung in histologischen Schnitten von 35 MF-Patientenbiopsien untersucht. Die Patienten wurden mit MF im Stadium IB, IIB oder III diagnostiziert.

In Übereinstimmung mit den Zelllinienbefunden, zeigten alle Leukozytenproben von Sézary-Syndrom-Patienten (4/4) eine schwache TNF-R1-Expression, die jedoch auch in PBMCs von gesunden Spendern nachweisbar war. Ebenso war in 2/4 Sézary-Syndrom-Patientenproben sowie in der Hälfte der Kontrollproben eine verminderte Expression der

Initiatorcaspase-10 nachweisbar. Im Unterschied zu den CTCL-Zelllinien, in denen beide FLIP-Isoformen nachweisbar waren, zeigte sich in drei der vier Leukozytenproben von SzS-Patienten nur c-FLIP_L exprimiert. In drei der sechs PBMC-Kontrollen von gesunden Spendern war ebenfalls c-FLIP_L-Expression nachweisbar. Interessanterweise zeigten die PBMC-Proben von SzS-Patienten mit intensiver Vorbehandlung (Psoralen + UVA-behandelt/IFN- α , Methotrexat, Chlorambucil/Prednisolon, extrakorporale Photochemotherapie (ECP) und Leukapherese) die schwächste c-FLIP_L-Expression (Abbildung 20 A, B).

Der Nachweis der Expression von c-FLIP mittels immunhistologischer Färbung in 35 MF-Patientenbiopsien aus Tumorläsionen erreichte eine durchschnittliche Positivität von 60%. Wenngleich es keinen spezifischen, molekularen Marker für die Unterscheidung von Tumor-T-Zellen und Tumor-infiltrierenden T-Zellen gibt, kann davon ausgegangen werden, dass die Mehrheit der T-Zellen in den MF-Biopsien Tumorzellen sind. Diese Annahme gilt in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung und für alle Lymphozyten in den hier dargestellten Pautrier'schen Mikroabzessen (Abbildung 20 C). Grundsätzlich wurden alle histologischen Schnitte mittels CD3- und Giemsa-Färbung kontrolliert. Wenn man die c-FLIP-Expression in Bezug zu den verschiedenen Stadien der MF-Patienten setzt, zeigt sich, dass in frühen Stadien wie IB bis zu 70% der Lymphozyten c-FLIP-positiv sind, wohingegen in späteren Stadien wie IIB/III nur noch 40% positiv sind (Mann-Whitney-U-Test: $p < 0,04$) (Abbildung 20 C). Dies könnte auf eine wichtige Rolle von c-FLIP, vor allem in den frühen MF-Stadien, hindeuten.

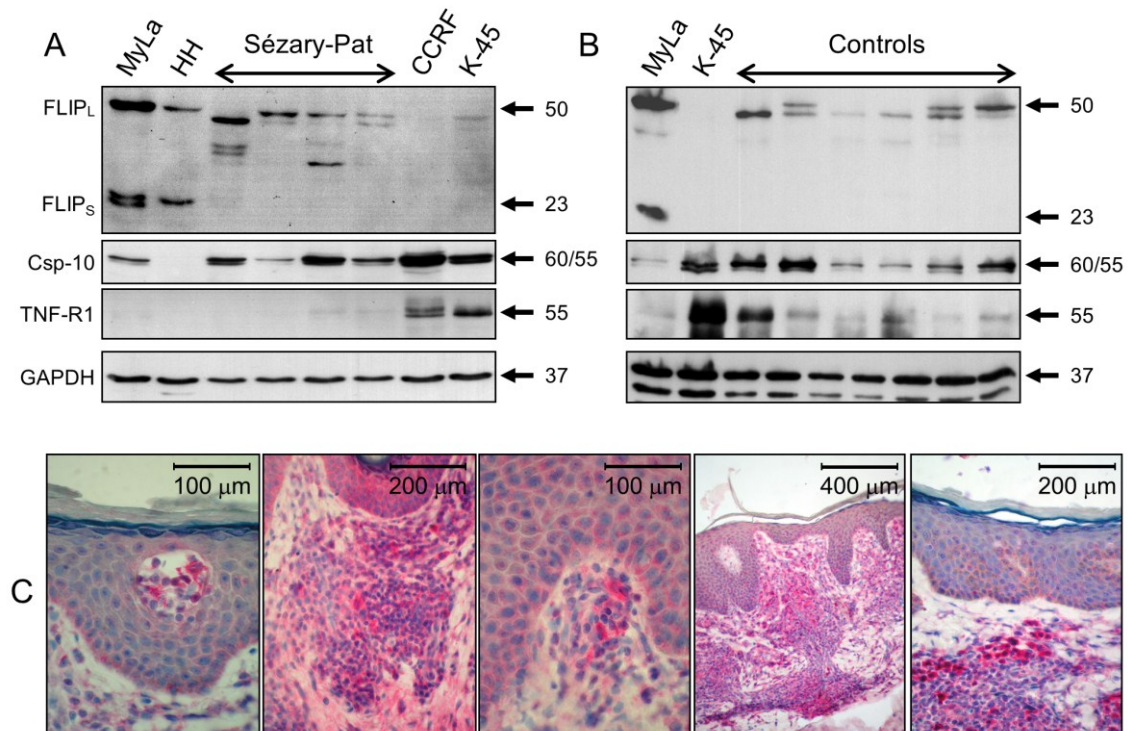


Abbildung 20 Expression von c-FLIP in CTCL-Tumorzellen.

(A) Die Expression von Caspase-10-Proform (60 und 55 kDa), TNF-R1 (55 kDa), c-FLIP_L (50 kDa) und c-FLIP_S (23 kDa) wurde in PBMCs von vier verschiedenen Sézary-Syndrom-Patienten mittels Westernblot-Analyse untersucht. Zum Vergleich wurden Proteinextrakte von zwei T-ALL- (CCRF-CEM und Karpas-45) und zwei CTCL- (HH und MyLa) Zelllinien aufgetragen (links und rechts). (B) Als Kontrollen wurden PBMC-Proteinextrakte von gesunden Spendern untersucht. Hier wurden zum Vergleich Proteinextrakte von T-ALL- (Karpas-45) und CTCL- (MyLa) Zelllinien mit aufgetragen (links). Der gleichmäßige Proteintransfer wurde mittels Ponceau-Färbung, eine gleichmäßige Proteinladung (25 µg/Bahn) mittels GAPDH-Expression als Ladekontrolle bestätigt. Mindestens zwei unabhängige Experimente, mit jeweils vergleichbaren Ergebnissen, wurden durchgeführt. (C) Der Nachweis von c-FLIP-Expression in Biopsien von fünf verschiedenen MF-Patienten, wie hier dargestellt, erfolgte mittels Immunhistologie.

2.6 CD30-vermittelte Inhibition von CD95-induzierter Apoptose

Eine starke Oberflächenexpression des kostimulatorischen CD30-Rezeptors stellt ein charakteristisches Merkmal von kutanen ALCL-Zellen dar. Jedoch ist dessen Einfluss auf andere Signalwege noch wenig untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Rolle von CD30-Signalgebung in der Apoptoseregulation in cALCL-Zelllinien untersucht. Die Aktivierung des CD30-Rezeptors mittels agonistischem anti-CD30-Antikörper (Ki-1) für 16 h resultierte, im Vergleich zu IgG3 stimulierten Kontrollzellen, in einer signifikanten Verminderung der basalen Apoptoserate in allen vier cALCL-Zelllinien (Abbildung 21 A, oben). In drei der cALCL-Zelllinien war keine Zytotoxizität und in

Mac-2A-Zellen lediglich eine geringe Zytotoxizität durch die CD30-Stimulation nachweisbar (Abbildung 21 A, unten).

Um die zu untersuchenden Effekte besser beurteilen zu können, wurde der agonistische anti-CD95-Antikörper CH-11 (10 ng/ml, 8 h) in einer geringeren Konzentration als bisher eingesetzt. Aber auch in dieser Konzentration war eine signifikante Apoptoseinduktion nachweisbar. Eine Vorbehandlung der Zellen mit Ki-1 (0,5 µg/ml) für 16 h führte zu einer deutlichen Verminderung der CD95-induzierten Apoptose (Abbildung 21 B). Dies war für JK- und Mac-2B-Zellen auch im Vergleich zu IgG3-Kontrollantikörper-behandelte Zellen signifikant. Eine Quantifizierung der apoptotischen, hypodiploiden Sub-G1-Zellpopulationen mittels Propidiumjodid (PI) DNS-Färbung bestätigte die mit dem ELISA bestimmte Verminderung der CH-11-induzierten (10 ng/ml, 8 h) Apoptose nach Ki-1- (0,5 µg/ml, 16 h) Vorbehandlung (Abbildung 21 D und E).

Überdies zeigte sich der anti-apoptotische Effekt der CD30-Stimulation auch in einer veränderten Caspasenaktivierung. Die Stimulation von CD95 (CH-11, 10 ng/ml) für 8 h führte in cALCL-Zelllinien (Mac-1 und Mac-2B) zu einer deutlichen Aktivierung der Initiatorcaspase-8 und der Effektorcaspase-3. Dies ist durch das Auftreten spezifischer Spaltprodukte (18 kDa für Caspase-8 und 12, 17, 20 kDa für Caspase-3) erkennbar (Abbildung 21 C). Eine Vorbehandlung der Zellen mit Ki-1 (0,5 µg/ml) für 16 h führte dann, parallel zur verminderten Apoptose, auch zu einer deutlich schwächeren Aktivierung der Initiatorcaspase-8 und der Effektorcaspase-3 (Abbildung 21 C). Eine Erklärung für die Abnahme der Caspase-8-Proform, bei gleichzeitigem Fehlen von aktiven Spaltprodukten, mag in der Aktivierung weiterer CD30-abhängiger Signalwege zu finden sein.

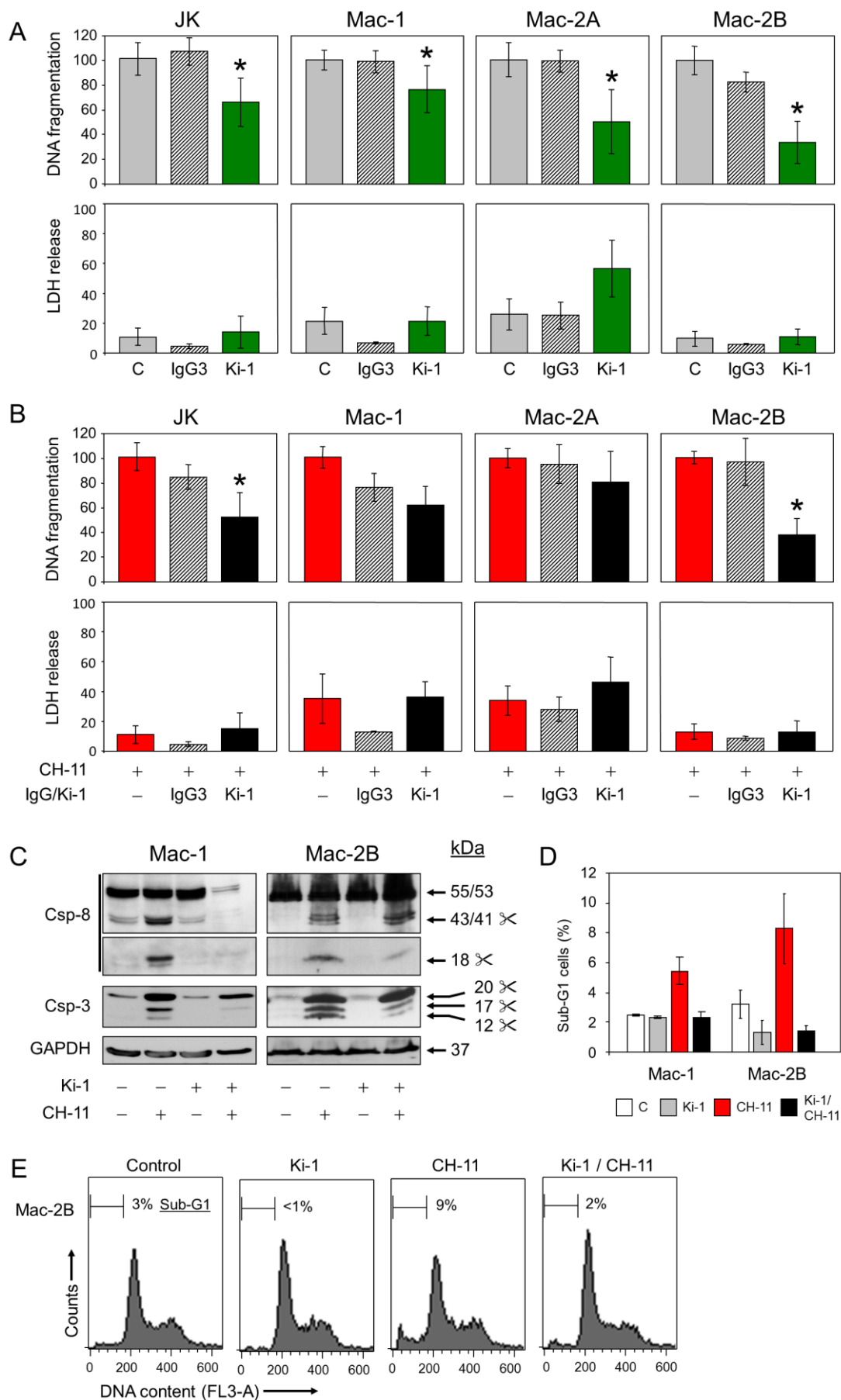


Abbildung 21 Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abbildung 21 Verminderung der Basalapoptose sowie reduzierte Sensitivität gegenüber CD95 nach CD30-Stimulation.

(A) Vier cALCL-Zelllinien wurden für 16 Stunden mit dem agonistischen anti-CD30-Antikörper Ki-1 (0,5 µg/ml) inkubiert und mit unbehandelten Kontrollen (Cs) sowie mit Zellen verglichen, die mit einem isotypischen IgG3-Kontrollantikörper (0,5 µg/ml) für 16 Stunden inkubiert wurden. Die DNS-Fragmentierung als Maß für die Apoptoseinduktion wurde bestimmt und als relative Apoptose (C = 100%) dargestellt. Die Bestimmung der Zytotoxizität erfolgte durch den Nachweis von LDH im Zellkulturüberstand. Dargestellt ist die LDH-Freisetzung in Prozent; hierfür wurden alle Proben auf Triton X-100 lysierte unbehandelte Kontrollen (C = 100%) bezogen. (B) cALCL-Zelllinien wurden 16 Stunden mit Ki-1-Antikörper oder IgG3-Kontrollantikörper (je 0,5 µg/ml) vorinkubiert, gefolgt von 8 Stunden mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH-11 (10 ng/ml). Dargestellt ist die relative Apoptose und Zytotoxizität der kostimulierten Proben im Vergleich zu nur CH-11 stimulierten Proben. Für die Berechnung der relativen Apoptose wurden CH-11-behandelte Proben auf 100% gesetzt und für die relative Zytotoxizität wurden Triton X-100 lysierte unbehandelte Kontrollen auf 100% gesetzt und alle entsprechenden Proben darauf bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte mit \pm SD von mindestens sechs Einzelwerten aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz wurde mittels Student'sche *t*-Verteilung berechnet und bei einem *p*-Wert von $< 0,05$ mit [*] gekennzeichnet. (C) Die Prozessierung von Caspase-8 und -3 wurde mittels Westernblot-Analyse untersucht. Hierfür wurden Mac-1- und Mac-2B-Zellen für 16 Stunden mit dem agonistischen anti-CD30-Antikörper Ki-1 (0,5 µg/ml) vorinkubiert, gefolgt von weiteren 8 Stunden mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH-11 (10 ng/ml). Diese Proben wurden zu unbehandelten, mit nur Ki-1- oder nur CH-11-behandelten Proben verglichen. Die jeweiligen Molekulargewichte der Caspasen-Proformen und deren Spaltprodukte sind in kDa angegeben. Der gleichmäßige Proteintransfer wurde mittels Ponceau-Färbung sowie eine gleichmäßige Proteinladung (20 µg/Bahn) mittels GAPDH-Expression als Ladekontrolle bestätigt. Mindestens zwei unabhängige Experimente, mit jeweils vergleichbaren Ergebnissen, wurden durchgeführt. (D) Die Quantifizierung der apoptotischen, hypodiploiden Sub-G1-Zellpopulationen von behandelten Mac-1- und Mac-2B-Zellen erfolgte mittels Durchflußzytometrie. Hierfür wurden die unbehandelten, Ki-1 (0,5 µg/ml, 24 h), mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH-11 (10 ng/ml, 8 h) oder mit beiden Antikörpern inkubierte Zellen mit PI-Lösung gefärbt und der DNS-Gehalt quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte mit \pm SD eines repräsentativen Experimentes, durchgeführt mit Dreifachwerten. (E) Repräsentative Histogramme von behandelten Mac-2B-Zellen sind dargestellt und die Sub-G1-Zellpopulationen sind in Prozent gekennzeichnet.

2.7 Aktivierbarkeit der NF- κ B-Signalwege durch CD30-Stimulation

Eine grundsätzliche Aktivierbarkeit von NF- κ B (mittels EMSA) durch CD30-Stimulation konnte bereits in cALCL gezeigt werden (Levi *et al*, 2000). Im Zentrum dieser Untersuchung stand der Nachweis der Aktivierbarkeit des kanonischen und des alternativen NF- κ B-Signalweges durch CD30-Stimulation. Dazu wurden Proteinextrakte von CD30-stimulierten cALCL-Zelllinien (JK, Mac-1, Mac-2A und Mac-2B) hinsichtlich des proteosomalen Abbaus von I- κ B α , als Marker für die Aktivierung des kanonischen, und die Prozessierung von p100 zu p52, als Marker für die Aktivierung des alternativen NF- κ B-Signalweges, untersucht (Abbildung 22 A). Für den Nachweis der I- κ B α -Degradation wurden die Zellen für 30 min bzw. für den Nachweis der p100 zu p52-Prozessierung für 16 h mit CD30 stimuliert. Dies war notwendig, da die Spaltung von I- κ B α , im Vergleich zur Prozessierung von p100, ein schneller Prozess ist. Des Weiteren

konnte eine Kernlokalisierung der NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 in allen CD30-stimulierten cALCL-Zelllinien nachgewiesen werden und war bei der Zelllinie Mac-1 am deutlichsten ausgeprägt (Abbildung 22 B).

Für die Blockierung der Aktivierung von NF- κ B wurde der Proteasom-Inhibitor LLnL sowie der allosterische IKK-Inhibitor BMS-345541 eingesetzt. Beide Inhibitoren, LLnL (4 μ M) und BMS-345541 (2 μ M), konnten bei einer Vorinkubation von 3 h in Mac-2B-Zellen die CD30-medierte Degradation von I- κ B α sowie die Prozessierung von p100 zu p52 blockieren (Abbildung 22 C).

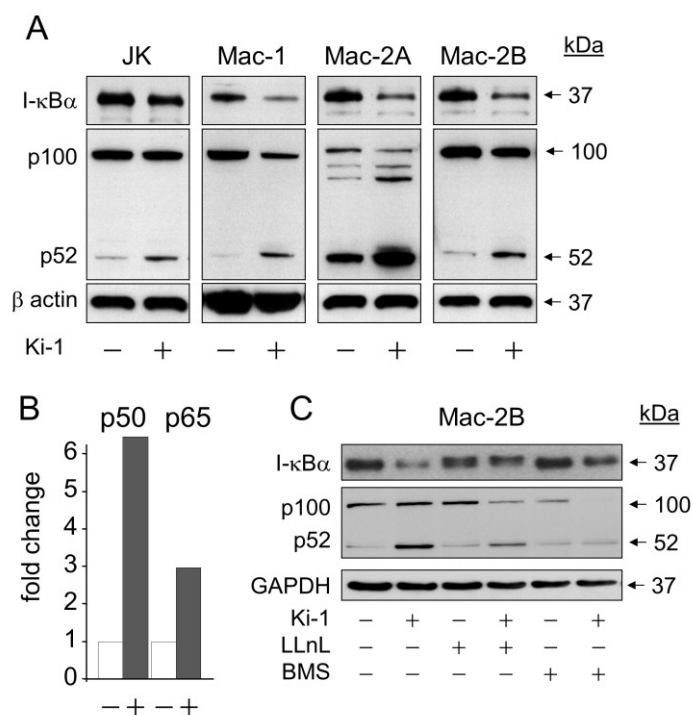


Abbildung 22 CD30-vermittelte NF- κ B-Aktivierung in CTCL-Zellen.

(A) Aktivierbarkeit der NF- κ B-Signalwege (kanonischer und alternativer) durch CD30-Stimulation ist mittels Westernblot-Analyse untersucht worden. Dargestellt ist der Abbau von I- κ B α (37 kDa) nach 30 min CD30-Stimulation sowie die Prozessierung von p100 (100 kDa) zu p52 (52 kDa) nach 16 Stunden CD30-Stimulation. Der gleichmäßige Proteintransfer wurde mittels Ponceau-Färbung, eine gleichmäßige Proteinladung (12 μ g/Bahn) mittels β -Actin als Ladekontrolle bestätigt. Mindestens zwei unabhängige Experimente, mit jeweils vergleichbaren Ergebnissen, wurden durchgeführt. (B) Dargestellt ist die Kerntranslokation der NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 in Mac-1-Zellen nach Inkubation mit anti-CD30-Antikörper Ki-1 (0,5 μ g/ml) für 16 Stunden. Die Ergebnisse des NF- κ B-ELISA wurden einmal reproduziert. Die Werte der Kernlokalisierung von p50 und p65 (gefüllte Balken) sind als relative Werte, bezogen auf die jeweiligen unbehandelten Kontrollen (offene Balken), zu verstehen. (C) Die Blockierung der NF- κ B-Signalwege (kanonischer und alternativer) wurde mittels Westernblot-Analyse in Mac-2B-Zellen untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit dem NF- κ B-Inhibitor LLnL (4 μ M) oder BMS345541 (2 μ M) für 3 Stunden vorinkubiert und anschließend für weitere 16 Stunden mit anti-CD30-Antikörper Ki-1 inkubiert. Zusätzlich wurden Proteinextrakte nach 30 min Ki-1- (0,5 μ g/ml) Stimulation für die I- κ B α -Analyse hergestellt. Der gleichmäßige Proteintransfer wurde mittels Ponceau-Färbung, eine gleichmäßige Proteinladung (12 μ g/Bahn)

mittels GAPDH-Expression als Ladekontrolle bestätigt. Mindestens zwei unabhängige Experimente, die jeweils ähnliche Ergebnisse zeigten, wurden durchgeführt.

2.8 CD30-Stimulation führt zu einer Verstärkung der c-FLIP-Expression

In Untersuchungen der mRNA-Expression verschiedener NF- κ B-Zielproteine zeigte sich in CD30-stimulierten cALCL-Zelllinien ein erhöhtes c-FLIP-mRNA-Level (Braun *et al*, 2010). Weitere Untersuchungen zur Proteinexpression mittels Westernblot-Analyse bestätigten, dass auch das c-FLIP-Proteinlevel durch CD30-Stimulation erhöht wird. Der Zusammenhang zwischen CD30-Stimulation und der Aktivierung von NF- κ B-Signalwegen, die zu einer verstärkten Expression von c-FLIP führen, konnte mittels NF- κ B-Inhibitoren (LLnL und BMS-345541) nachgewiesen werden. Die Vorbehandlung mit LLnL (1 μ M, 3 h) oder BMS-345541 (2 μ M, 3 h, für JK, Mac-2A, Mac-2B sowie 0,1 μ M für Mac-1) führte zu einem deutlich verminderten Anstieg der c-FLIP-Expression durch CD30-Stimulation (Abbildung 23 A). Lediglich in Mac-1 war keine Reduktion in der Ki-1-medierte Hochregulation von c-FLIP nachweisbar, da BMS-345541 bei zunehmender Konzentration bereits signifikant Apoptose induzierte. Zusätzlich wurde der Einfluss von CD95-Aktivierung (CH-11) auf die c-FLIP-Expression in CD30-stimulierten Mac-2B-Zellen untersucht. Die Stimulation von CD30 für 12, 16 und 20 h führte zu einer deutlichen Hochregulation von c-FLIP. Die Aktivierung von CD95 für 8 h führte zu einem kompletten Abbau von c-FLIP. In den CD30/CD95-kostimulierten Proteinextrakten war dieser vollständige Abbau von c-FLIP nicht mehr nachweisbar (Abbildung 23 B). Dies könnte eine Erklärung für die verminderte Apoptoseinduktion in den CD30/CD95-behandelten Zellen sein. Weitere mögliche Kandidaten für die Vermittlung von CD95-Resistenz könnten die Proteine FADD oder Bid sein. Diese werden jedoch durch CD30-Stimulation nicht in ihrer Expression verändert (Abbildung 23 C).

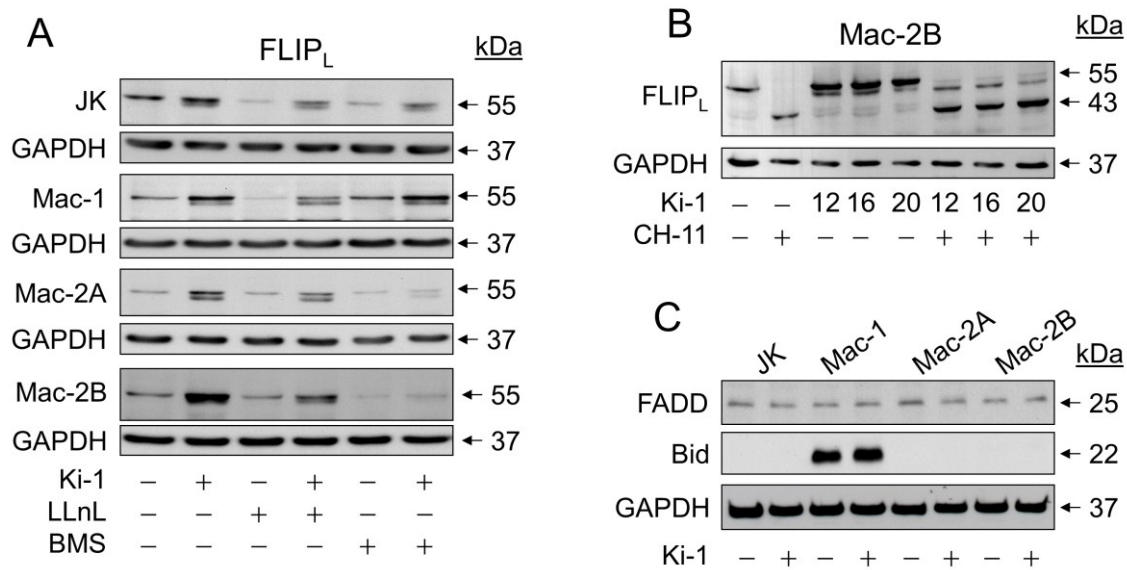


Abbildung 23 CD30-vermittelte Hochregulation von c-FLIP_L.

(A) Vier cALCL-Zelllinien (JK, Mac-1, Mac-2A und Mac-2B) wurden für 3 h mit dem Proteasom-Inhibitor LLnL (1 μ M) oder BMS345541 (2 μ M für 3 Linien sowie 0,1 μ M für Mac-1) inkubiert und anschließend für weitere 16 h mit dem agonistischen anti-CD30-Antikörper Ki-1 (0,5 μ g/ml) stimuliert. Die Expression von c-FLIP_L (55 kDa) wurde mittels Westernblot-Analyse untersucht. (B) Mac-2B-Zellen wurden mit dem agonistischen anti-CD30-Antikörper Ki-1 (0,5 μ g/ml) für 12, 16 und 20 h alleine und in Kombination mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH-11 (50 ng/ml, 8 h) inkubiert. Anschließend wurde mittels Westernblot-Analyse die Expression sowie die Prozessierung von c-FLIP_L untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Stimulation von CD30 zu einer Hochregulation der c-FLIP_L-Proform (55 kDa) und die Inkubation mit CH-11 zu einer 43 kDa großen, prozessierten c-FLIP-Form führte. (C) Die Expression von FADD und Bid wurde für vier cALCL-Zelllinien, die für 16 h mit dem agonistischen anti-CD30-Antikörper Ki-1 (0,5 μ g/ml) inkubiert wurden, mittels Westernblot-Analyse untersucht. Der gleichmäßige Proteintransfer wurde mittels Ponceau-Färbung, eine gleichmäßige Proteinladung (20 μ g/Bahn) mittels GAPDH-Expression als Ladekontrolle bestätigt. Mindestens zwei unabhängige Experimente, mit jeweils vergleichbaren Ergebnissen, wurden durchgeführt.

2.9 Wiederherstellung der Sensitivität mittels c-FLIP-Knockdown

Als Nachweis der Bedeutung von erhöhter c-FLIP-Expression für die Resistenz gegenüber CD95-induzierter Apoptose, wurde die Expression von c-FLIP in Mac-2B-Zellen mittels anti-c-FLIP-siRNA herabreguliert. Dazu wurden die Zellen mit einem lentiviralen Vektor (cFLIP^{RNAi}) transduziert. Als Kontrollen wurden Vektoren ohne Insert (Mock) und mit non-sense siRNA (Scramble^{RNAi}) verwendet. Die Transduktionseffizienz wurde anhand der GFP-Expression (*green fluorescent protein*) ermittelt. Es zeigte sich im Allgemeinen eine Transduktionseffizienz von 70% für Mock-, von 80% für Scramble^{RNAi}- und 60% für cFLIP^{RNAi}-transduzierte Zellen. In Mac-2B-Zellen konnte eine deutliche Herabregulation von c-FLIP sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene durch die cFLIP^{RNAi}-Lentiviren nachgewiesen werden (Abbildung 24 A).

Der Nachweis der Apoptoseinduktion nach CD30- und/oder CD95-Stimulation erfolgte sowohl mittels DNS-Fragmentierungs-ELISA als auch durch die Quantifizierung der apoptotischen, hypodiploiden Sub-G1-Zellpopulationen (PI-Färbung). Es konnte so nachgewiesen werden, dass die erhöhte Expression von c-FLIP für die Resistenz gegenüber CD95-induzierter Apoptose verantwortlich ist. Überdies zeigte sich, dass der Verlust von c-FLIP alleine bereits zu einer erhöhten Basalapoptose führt (Abbildung 24 B).

Ebenso zeigte sich in cFLIP^{RNAi}-transduzierten Mac-2B-Zellen eine wiederhergestellte Aktivierung der Caspasensignalkaskade (Abbildung 24 C). Im Vergleich dazu konnte in Mock- und Scramble^{RNAi}-transduzierten Zellen die mit der Apoptoseresistenz in Zusammenhang stehende verminderte Caspasenaktivierung nachgewiesen werden. Die verminderte Expression von c-FLIP in cFLIP^{RNAi}-transduzierten Zellen führte zu einer erhöhten Basalapoptose sowie zu einer Caspasenaktivierung. Entsprechend war in den cFLIP^{RNAi}-transduzierten Mac-2B-Zellen auch die Aktivierung der Caspasensignalkaskade ausgeprägter.

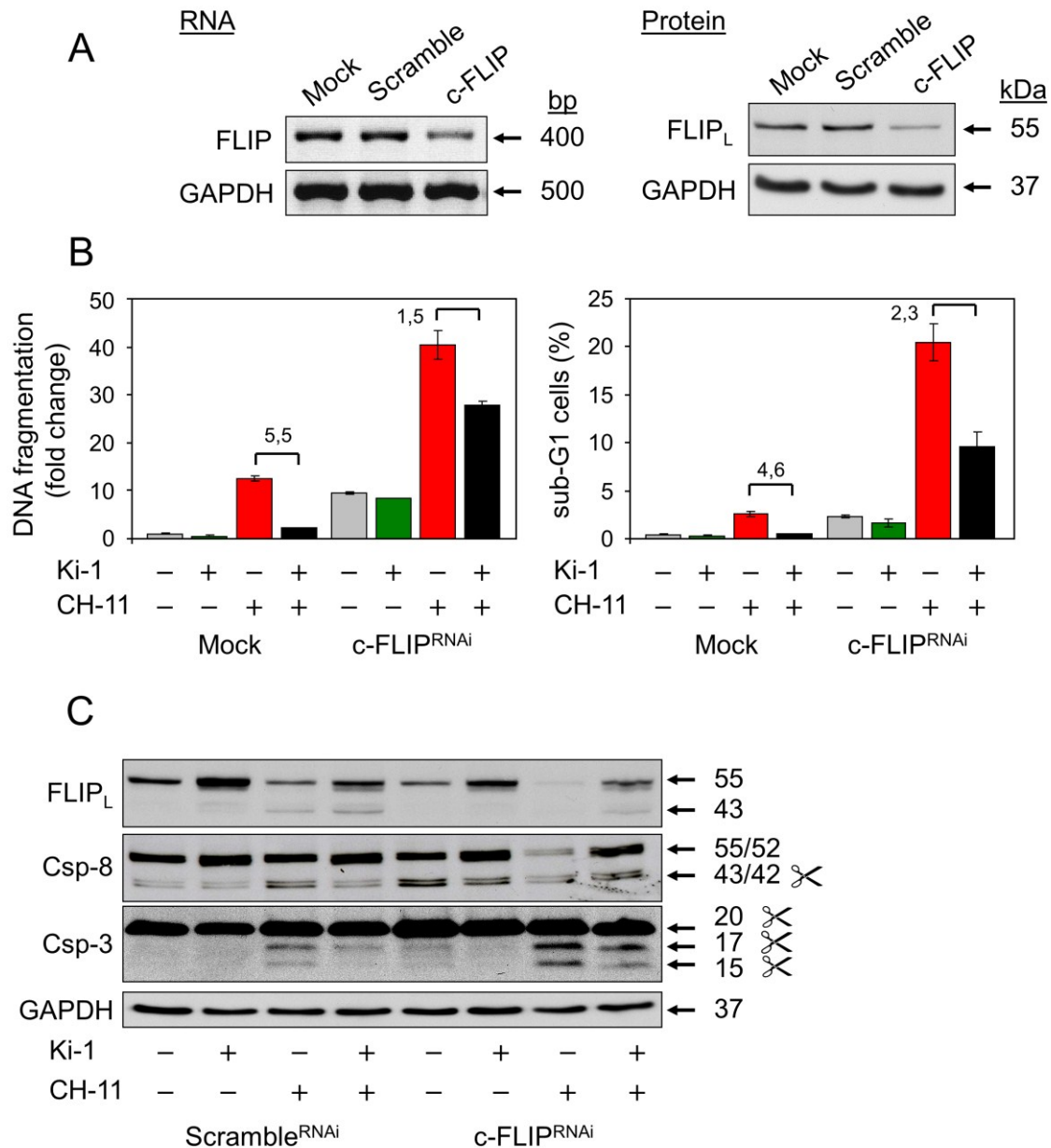


Abbildung 24 Wiederherstellung der CD95-Sensitivität durch c-FLIP-Knockdown.

(A) Dargestellt ist die Expression von c-FLIP-mRNA (RT-PCR) und c-FLIP-Protein (Westernblot-Analyse) von Mac-2B-Zellen, die mit cFLIP^{RNAi}-, Scramble^{RNAi}- oder Mock-transduziert wurden. Mittels GAPDH (Amplifikat- oder Protein-Expression) wurde die gleiche Ladung von RT-PCR und Westernblot-Analyse bestätigt. Größen sind in Basenpaaren (bp) bzw. in kDa angegeben. In drei unabhängigen Experimenten wurden vergleichbare Ergebnisse ermittelt. (B) Die Apoptoseinduktion in Mock- und cFLIP^{RNAi}-transduzierten Mac-2B-Zellen wurde mittels DNS-Fragmentierung (linke Seite) und durch die Quantifizierung der apoptotischen Sub-G1-Zellpopulationen (rechte Seite) bestimmt. Der parallel hierzu durchgeführte Nachweis der Zytotoxizität ergab keine signifikante LDH-Freisetzung (Daten nicht gezeigt). Für die dargestellte relative Apoptose (linke Seite) wurden die absoluten Apoptose-Werte auf die Zellzahl, wie sie anhand des LDH-Gehaltes bestimmt wurden, normalisiert. Die cFLIP^{RNAi}-transduzierten Zellen wurden mit Mock-transduzierten Zellen verglichen. Scramble^{RNAi}-transduzierte Zellen zeigten ein zu Mock-transduzierten Zellen vergleichbare Apoptoseinduktion (Daten nicht gezeigt). Die transduzierten Zellen wurden mit agonistischem anti-CD30-Antikörper Ki-1 (0,5 µg/ml, 16 h) vorbehandelt und anschließend für weitere 8 h mit dem antagonistischen anti-CD95-Antikörper CH-11 (10 ng/ml) inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit \pm SD eines repräsentativen Experiments, durchgeführt mit Dreifachwerten. Ki-1-medierte Apoptoseresistenz ist als Faktor angegeben. Drei

unabhängige Experimente, die vergleichbare Ergebnisse ergaben, wurden durchgeführt. (C) Dargestellt sind die Expression von c-FLIP sowie die Prozessierung von Caspase-8 und -3 für cFLIP^{RNAi}- und Scramble^{RNAi}-transduzierte Mac-2B-Zellen. Die Zellen wurden mit dem agonistischen anti-CD30-Antikörper Ki-1 (0,5 µg/ml, 16 h) vorbehandelt und anschließend für weitere 8 h mit dem antagonistischen anti-CD95-Antikörper CH-11 (10 ng/ml) inkubiert. Eine nahezu vollständige Prozessierung der Caspase-8-Proform (55/53 kDa) zeigte sich in cFLIP^{RNAi}-transduzierten und CH-11-inkubierten Zellen. Mock-transduzierte Zellen verhielten sich diesbezüglich wie Scramble^{RNAi}-transduzierte Zellen (Daten nicht gezeigt). Gleichmäßige Proteinladung (30 µg/Bahn) wurde mittels Ponceau-Färbung sowie GAPDH-Expression bestätigt. Ein zweites unabhängiges Experiment, ausgehend von unabhängigen Kulturen, ergab vergleichbare Ergebnisse.

2.10 Nachweis von Bid- und c-FLIP-Expression in Patientenproben

Der Nachweis von c-FLIP- und Bid-Expression in cALCL-Patientenbiopsien erfolgte mittels immunhistologischer Färbung. Die Identifikation von Tumorzellen erfolgte anhand morphologischer Kriterien sowie der charakteristischen CD30-Expression. Bereiche mit über 75% CD30-positiven Zellen weisen auf einen hohen Anteil an Tumorzellen hin. Die Tumorzellen wurden hinsichtlich ihrer c-FLIP- und Bid-Expression im Vergleich zu bystander- und reaktiven Lymphozyten evaluiert. Für die Auswertung wurde sowohl die Anzahl an Tumorzellen (in Prozent) als auch die Intensität der Färbung (1 schwach, 2 moderat, 3 stark) berücksichtigt. In Tumorzellen aller cALCL-Proben zeigte sich eine moderate Bid-Expression. Im Vergleich zu reaktiven Lymphozyten konnte eine deutlich geringere Bid-Expression in fünf von acht cALCL-Proben nachgewiesen werden (Abbildung 25, **Tabelle 4**).

Hinsichtlich der Expression von c-FLIP zeigte sich in sieben von acht Proben eine moderate Expression in der Mehrheit der Tumorzellen. Im Gegensatz dazu war in den reaktiven Lymphozyten nur eine schwache c-FLIP-Expression nachweisbar (Abbildung 25, **Tabelle 4**). Die verminderte Expression von Bid sowie die starke Expression von c-FLIP in Tumorzellen von Patientenläsionen belegen eine weitgehende Parallelität der *in vitro*-Ergebnisse mit der *in vivo*-Situation.

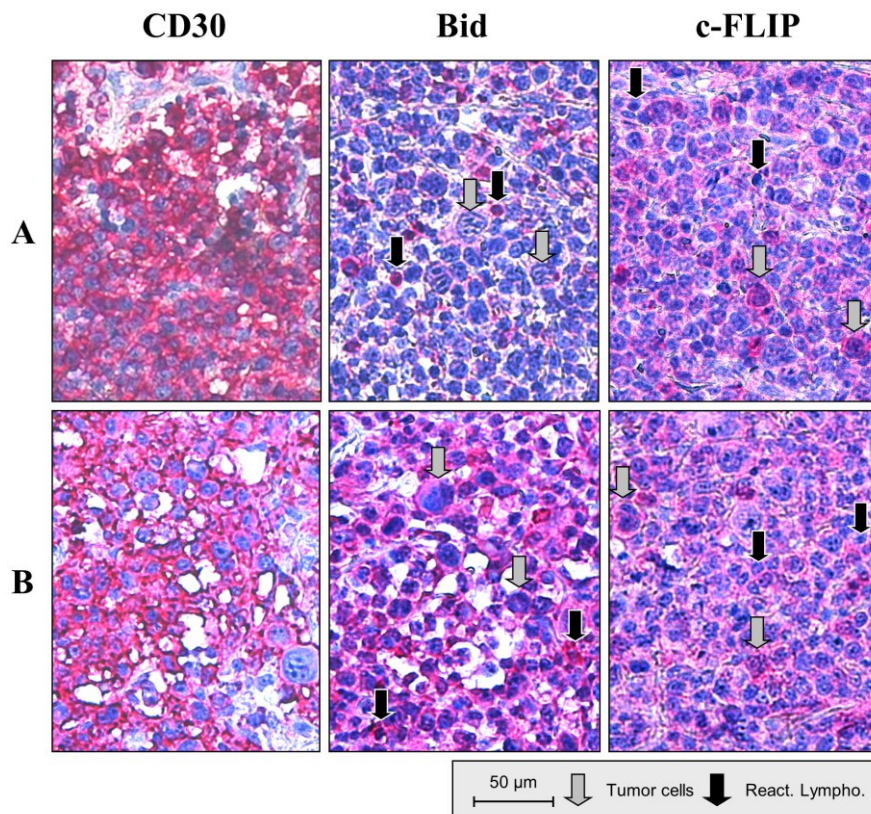


Abbildung 25 Expression von c-FLIP und verminderte Expression von Bid in cALCL-Tumorzellen.

Dargestellt sind zwei repräsentative Schnitte von CD30-positiven Tumorbiopsien von cALCL-Patienten (A und B). Diese wurden für CD30-, Bid- und c-FLIP-Expression gefärbt. Interessanterweise zeigte sich in großen Tumor-T-Zellen, im Vergleich zu den kleineren, reaktiven Lymphozyten, eine schwächere Expression von Bid. Die Expression von c-FLIP zeigte sich in den Tumorzellen als moderat im Vergleich zu den häufig negativen reaktiven Lymphozyten. Der dargestellte Maßstab gilt für alle Fotografien.

Tabelle 4 Evaluierung der immunhistologischen Färbung.

cALCL	CD30 (%)	Bid		c-FLIP	
		Tumorzellen	reakt. Lymphozyten	Tumorzellen	reakt. Lymphozyten
1	>75	50% (2)	90% (3)	30% (2)	10% (1)
2	>75	40% (2)	80% (3)	90% (1)	20% (1)
3	>75	70% (3)	20% (1)	90% (2)	10% (1)
4	>75	50% (2)	90% (2)	50% (2)	20% (1)
5	>75	50% (2)	30% (2)	90% (2)	20% (2)
6	>75	90% (2)	70% (3)	100% (2)	20% (2)
7	>75	70% (2)	90% (3)	80% (2)	20% (1)
8	>75	20% (2)	80% (3)	90% (2)	10% (2)

cALCL: cutaneous anaplastic large-cell lymphoma; c-FLIP: cellular FLICE-inhibitory protein; Bid: BH3-interacting domain death agonist;¹Dargestellt sind Tumorzellen und reaktive Lymphozyten von acht cALCL-Proben in Prozent. Die Einschätzung der Expressionsstärke ist wie folgt gestaffelt (1=schwach, 2=moderat, 3=stark)

2.11 Apoptoseinduktion und verminderte Zellvitalität durch NSAIDs

Für die Evaluierung der pro-apoptotischen und anti-proliferativen Effekte von nicht-steroidalen anti-inflammatorischen Substanzen (NSAIDs) in CTCL-Zelllinien, wurden HH- und MyLa-Zellen für 40 h mit steigender Konzentration von Acetylsalicylsäure (ASA, 1-5 mM), Natriumsalicylat (NaS, 1-5 mM) und Diclofenac (DF, 5-120 µg/ml) inkubiert. Die Bestimmung der Zellvitalität von NSAID-behandelten HH- und MyLa-Zellen mittels des WST-1-Assays ergab eine signifikante und dosisabhängige Verminderung der Zellvitalität (60-40% für HH und 80-40% für MyLa) (Abbildung 26 A). Zytotoxizität, bestimmt anhand der LDH-Freisetzung, zeigte sich nur geringfügig erhöht in Diclofenac-behandelten MyLa-Zellen (Abbildung 26 B). Parallel zur verminderten Zellvitalität zeigte sich eine ebenfalls deutliche und dosisabhängige Apoptoseinduktion mit bis zu 25% apoptotischen HH-Zellen und bis zu 10% apoptotischen MyLa-Zellen für alle drei NSAIDs (Abbildung 26 C). Dabei war die Apoptosinduktion in NaS-behandelten MyLa-Zellen vergleichsweise gering, was auf einen stärkeren anti-proliferativen Effekt von NaS hindeutet. Zellen, die mit Diclofenac (60 µg/ml) inkubiert wurden, zeigten überdies eine Tendenz zur Arretierung in der G2-Phase des Zellzykluses (Abbildung 26 D). Insgesamt konnte damit eine klare anti-tumorale Aktivität der untersuchten NSAIDs sowie deren Einfluss auf den Zellzyklus nachgewiesen werden.

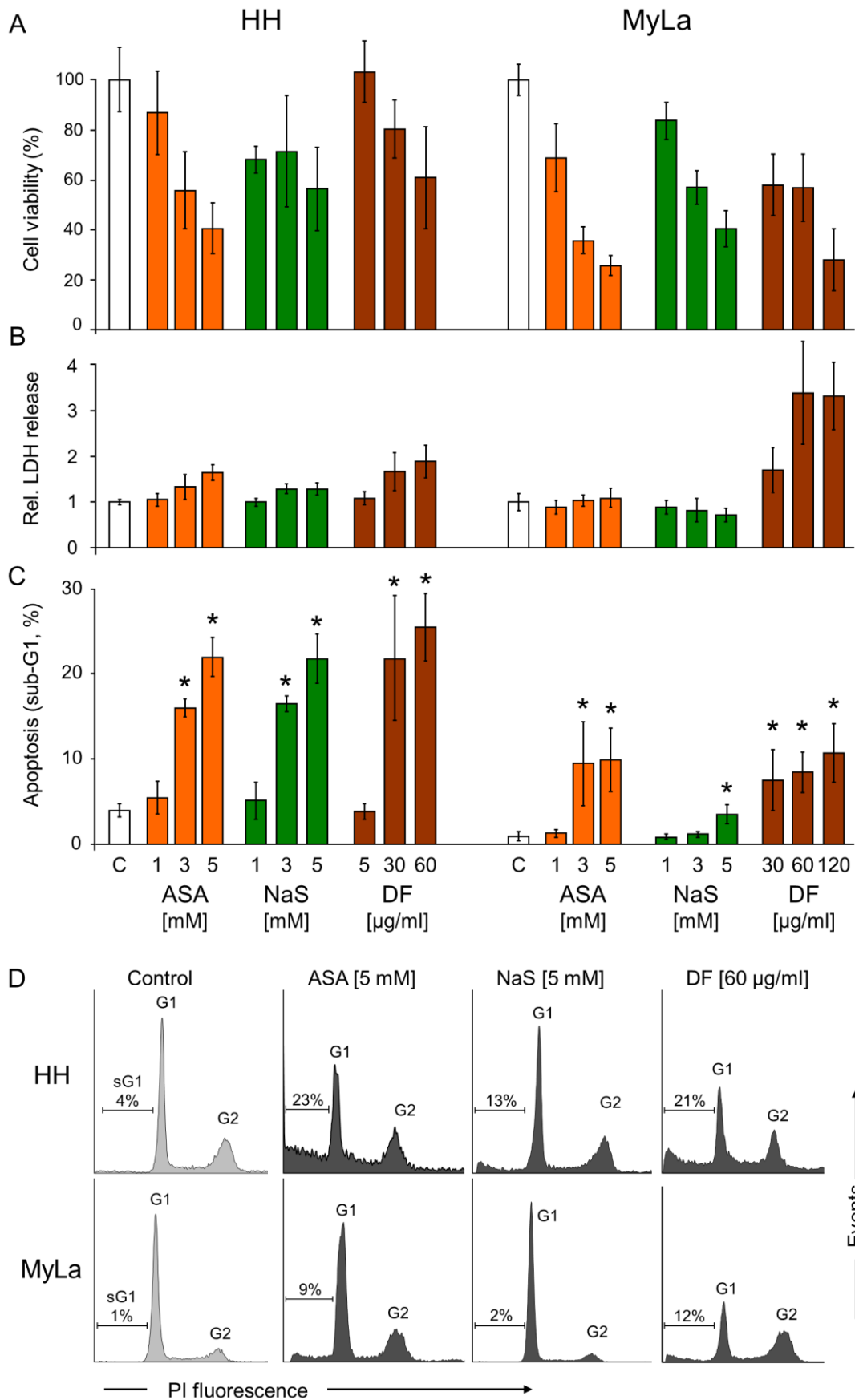


Abbildung 26 Abbildungslegende siehe nächste Seite.

Abbildung 26 NSAIDs vermindern die Zellvitalität und induzieren Apoptose in CTCL-Zellen.

Die CTCL-Zelllinien HH und MyLa wurden für 40 h mit drei NSAIDs ASA (1-5 mM), NaS (1-5 mM) und DF (5-120 µg/ml) inkubiert und die Apoptoseinduktion sowie die Zellvitalität bestimmt. (A) Dargestellt ist die relative Zellvitalität; hierfür wurden die NSAID-behandelten Zellen auf die unbehandelten Kontrollen ($C = 100\%$) normalisiert. (B) Die relative Zytotoxizität wurde mittels LDH-Freisetzung bestimmt und auf die unbehandelten Proben normalisiert ($C = 1$). (C) Nachweis der Apoptoseinduktion erfolgte durch PI-Färbung und wurde anhand der apoptotischen Sub-G1-Zellpopulationen quantifiziert und ist in Prozent angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte mit \pm SD von mindestens zwei unabhängigen Experimenten, durchgeführt mit Dreifachwerten. Die Signifikanz wurde mittels Student'sche t -Verteilung berechnet und bei einem p -Wert von $< 0,05$ mit [*] gekennzeichnet. (D) Repräsentative Histogramme von NSAID-behandelten Zellen sind dargestellt und die Sub-G1-Zellpopulationen sind angegeben in Prozent.

2.12 Caspasenaktivierung durch NSAIDs

Für eine weitere Aufklärung der in der NSAID-vermittelten Apoptose beteiligten Signalwege wurde die Prozessierung der Initiatorcaspasen-8 und -9, der Effektorcaspase-3 und von Bid mittels Westernblot-Analyse untersucht. In HH- und MyLa-Zellen zeigte sich nach der Inkubation mit den NSAIDs ASA (3 und 5 mM), NaS (3 und 5 mM) sowie DF (30 und 60 µg/ml) für 24 h eine starke und dosisabhängige Prozessierung der Caspase-8 und -3, was durch die Zunahme von spezifischen Caspasespaltprodukten gekennzeichnet war (Abbildung 27 A). Eine Spaltung von Bid zeigte sich in DF (60 µg/ml) behandelten MyLa-Zellen sowie eine schwache Prozessierung der Initiatorcaspase-9 in HH-Zellen (Abbildung 27 A).

Zusätzlich wurde die Beteiligung der Caspasensignalkaskade an der NSAIDs-induzierten Apoptose durch den Einsatz des Pancaspasen-Inhibitors Q-VD-Oph untersucht. Die NSAID-induzierte Apoptose zeigte sich deutlich vermindert in Q-VD-Oph vorbehandelten Zellen (Abbildung 27 B). Die Aktivierung von Caspasen sowie die verminderte Apoptoseinduktion durch Q-VD-Oph belegen eine Involvierung der Caspasensignalkaskade in der NSAID-induzierten Apoptose. Jedoch weist die nur partielle Blockierung der NSAID-induzierten Apoptose durch Q-VD-Oph in HH-Zellen auch auf zusätzliche Caspasen-unabhängige Effekte hin.

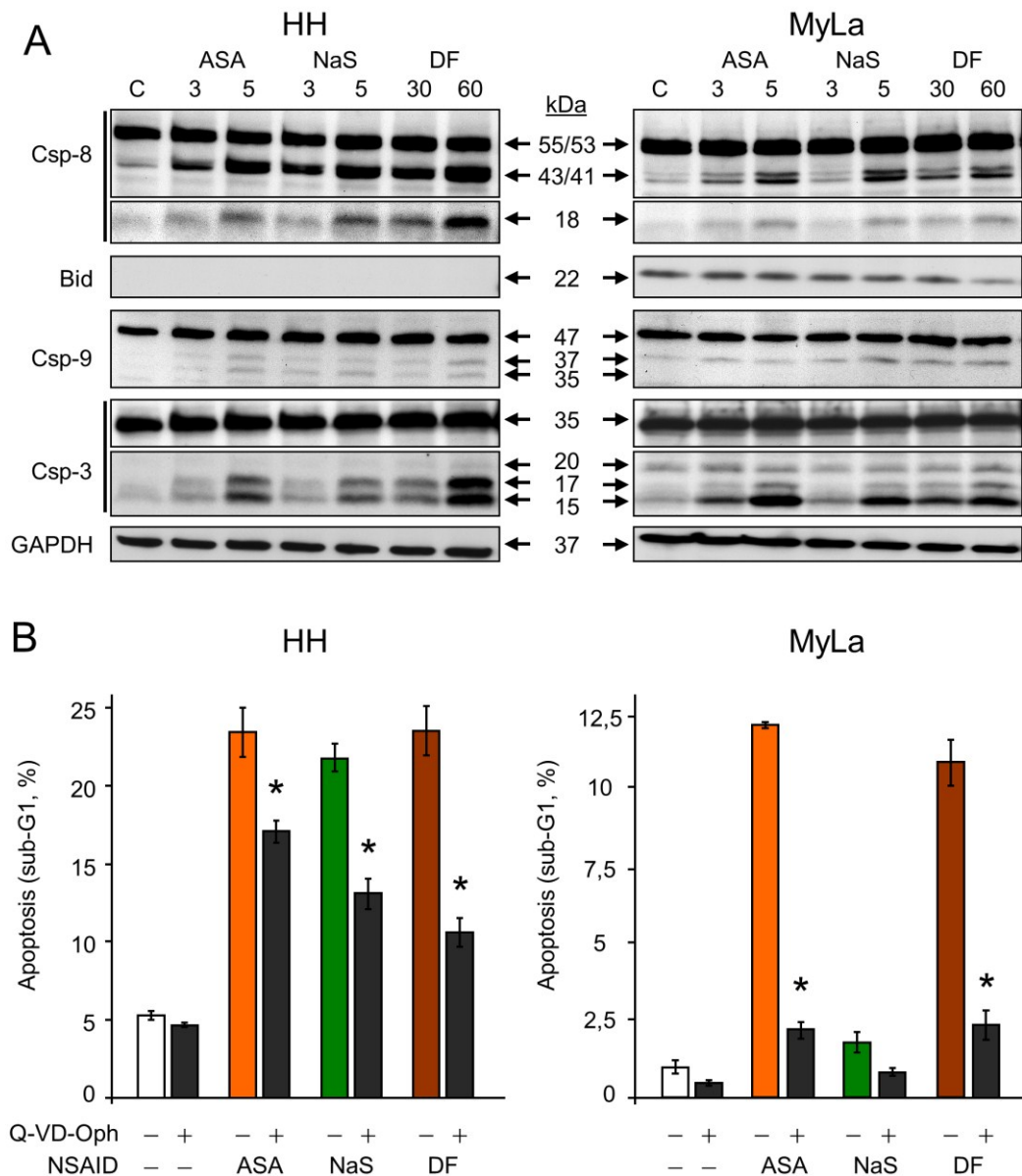


Abbildung 27 Aktivierung der Caspasensignalkaskade durch NSAIDs.

(A) Die Prozessierung der Caspase-8, -9 und -3 sowie die Spaltung von Bid wurde mittels Westernblot-Analyse untersucht. Hierfür wurden HH- und MyLa-Zellen für 40 h mit ASA (3 und 5 mM), NaS (3 und 5 mM) und DF (30 und 60 µg/ml) inkubiert. Unbehandelte Kontrollen sind gekennzeichnet (C). Dargestellt ist die Caspase-8-Proform (53 und 55 kDa) sowie deren Spaltprodukte (43, 45 und 18 kDa), die Caspase-9-Proform (45 kDa) sowie deren Spaltprodukt (35 und 37 kDa), die Procaspase-3 (35 kDa) sowie deren Spaltprodukte (20, 17, 15 kDa) und die Bid-Proform (22 kDa). Der gleichmäßige Proteintransfer wurde mittels Ponceau-Färbung sowie eine gleichmäßige Proteinladung (30 µg/Bahn) mittels GAPDH-Expression als Ladekontrollen bestätigt. (B) Dargestellt ist die Apoptoseinduktion entsprechend der durch PI-Färbung identifizierte Sub-G1-Zellpopulationen von HH- und MyLa-Zellen, die für 1 h mit dem Pancaspasen-Inhibitor Q-VD-Oph (50 µM für HH sowie 10 µM für MyLa) inkubiert wurden, gefolgt von weiteren 40 h mit ASA (5 mM), NaS (5 mM) und DF (60 µg/ml). Dargestellt sind Mittelwerte mit \pm SD eines repräsentativen Experiments, durchgeführt mit Dreifachwerten. Mindestens zwei unabhängige Experimente, mit jeweils vergleichbaren Ergebnissen, wurden durchgeführt. Die Signifikanz wurde mittels Student'sche *t*-Verteilung berechnet und bei einem *p*-Wert von $< 0,05$ mit [*] gekennzeichnet.

2.13 Aktivierung des mitochondrialen Signalweges

Im Zuge der Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalweges kommt es zu einem Einbruch des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$), der Translokation von Bax in die Mitochondrienmembran sowie zur Freisetzung von Cytochrom C. Mittels des kationischen Farbstoffes TMRM⁺ wurde das $\Delta\Psi_m$ von HH- und MyLa-Zellen nach Inkubation mit ASA (5 mM), NaS (5 mM) und DF (60 µg/ml) für 24 h und 40 h bestimmt. Für HH-Zellen zeigte sich durch alle drei NSAIDs ein starker Verlust des Membranpotentials sowohl nach 24 h als auch nach 40 h. Vergleichbares zeigte sich für MyLa-Zellen, die mit ASA und DF behandelt wurden. Keine Veränderung des $\Delta\Psi_m$ zeigte sich hingegen für NaS-behandelte MyLa-Zellen, was möglicherweise mit der schwachen pro-apoptotischen Wirkung in Zusammenhang stehen könnte (Abbildung 28 A und B). Parallel zur Untersuchung des $\Delta\Psi_m$ wurde die Apoptoseinduktion bestimmt, wobei sich zeigte, dass unter Bedingungen, die nach 40 h Apoptose induzieren, auch bereits nach 24 h Apoptose nachweisbar war (Daten nicht gezeigt). Zur Bestätigung der Aktivierung des mitochondrialen Signalweges wurde die Freisetzung von Cytochrom C sowie die Translokation von Bax in für 24 h und 40 h mit ASA- (5 mM), NaS- (5 mM) und DF- (60 µg/ml) behandelten HH- und MyLa-Zellen mittels Westernblot-Analyse untersucht. Im Gegensatz zum generellen Verlust des $\Delta\Psi_m$ durch NSAIDs in beiden Zelllinien ließ sich die Freisetzung von Cytochrom C sowie eine Translokation von Bax nur in DF-behandelten MyLa-Zellen, dann aber sowohl nach 24 h (Daten nicht gezeigt) als auch nach 40 h, nachweisen (Abbildung 28 C). Parallel zur Aktivierung des mitochondrialen Signalweges durch Diclofenac in MyLa-Zellen, war auch ein erhöhtes Level an ROS (*reactive oxygene species*) nachweisbar (Abbildung 28 D). Einen Einfluss auf die Mitochondrien ($\Delta\Psi_m$) scheint für alle NSAIDs charakteristisch zu sein, die vollständige Aktivierung des mitochondrialen Signalweges ist jedoch auf Diclofenac beschränkt.

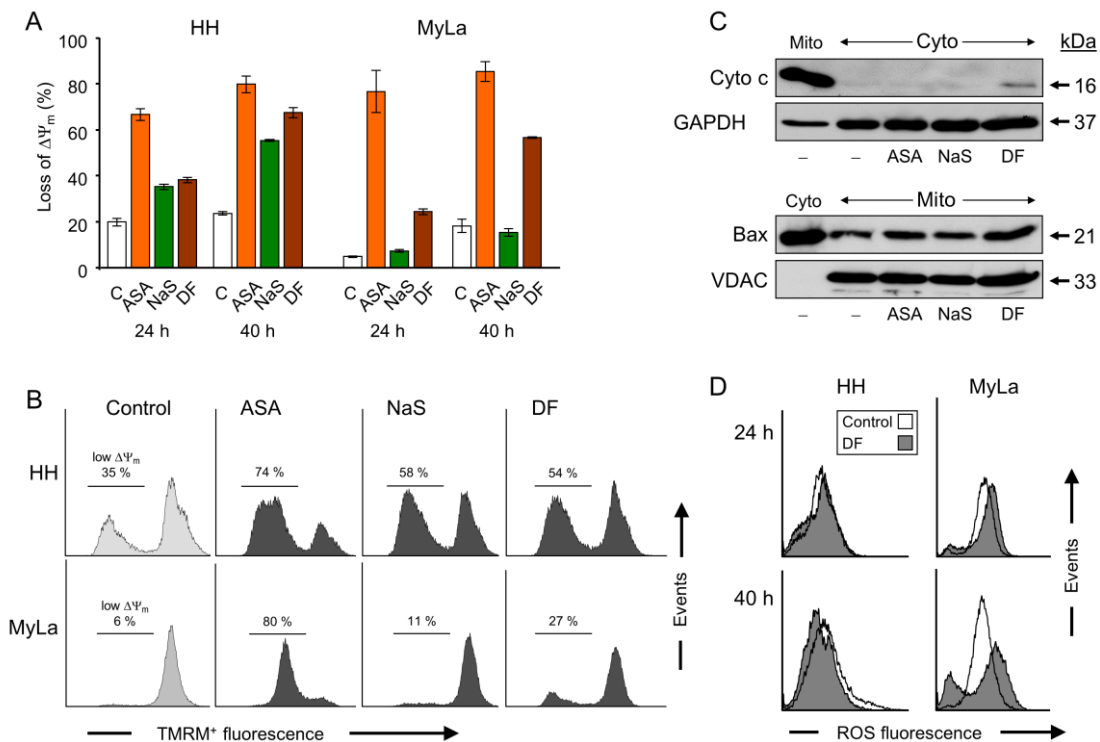


Abbildung 28 Verlust des $\Delta\Psi_m$, Freisetzung von Cytochrom C und Erhöhung von ROS.

(A) Mitochondriales Membranpotential $\Delta\Psi_m$ von HH- und MyLa-Zellen, die für 24 h und 40 h mit ASA (5 mM), NaS (5 mM) und DF (60 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert wurden, wurde mittels TMRM⁺-Färbung bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte mit $\pm\text{SD}$ eines repräsentativen, mit Dreifachwerten durchgeführten Experiments. Mindestens zwei unabhängige Experimente, mit vergleichbaren Ergebnissen, wurden durchgeführt. (B) Dargestellt sind repräsentative Histogramme von NSAID-behandelten Zellen (dunkel Grau) und unbehandelten Kontrollen (helles Grau). Die Zellpopulationen mit erniedrigtem $\Delta\Psi_m$ sind gekennzeichnet. (C) Für den Nachweis der Freisetzung von Cytochrom C in das Zytoplasma sowie einer mitochondrialen Translokation von Bax wurden MyLa-Zellen für 40 h mit NSAID-behandelt und Mitochondrien- und Zytosolfraktionen hergestellt und mittels Westernblot-Analyse untersucht. Für die zytosolischen Extrakte (cyto) wurden mitochondriale Extrakte (mito) als Kontrollen aufgetragen und umgekehrt. Der Nachweis von VDAC schloss eine Kontamination der zytosolischen Extrakte mit Mitochondrien aus. Ein gleichmäßiger Proteintransfer wurde mittels Ponceau-Färbung bestätigt und mittels GAPDH-Expression wurde eine gleichmäßige Ladung der zytosolischen Extrakte nachgewiesen. (D) Der Nachweis von ROS in HH- und MyLa-Zellen nach 24 h und 40 h DF-Inkubation (gefüllter Graph) erfolgte mittels H₂DCFDA-Färbung und wurde mit unbehandelten Zellen (offener Graph) verglichen. Drei unabhängige Experimente lieferten vergleichbare Ergebnisse.

2.14 Wichtige Rolle von c-FLIP in der NSAID-induzierten Apoptose

Für ein besseres Verständnis der Involvierung von pro- und anti-apoptotischen Faktoren in der NSAID-induzierten Apoptose, wurde die Expression von wichtigen Apoptosemediatoren mittels Westernblot-Analyse untersucht. Hierbei zeigte sich in NSAID-behandelten Zellen keine signifikante Veränderung in der Expression von Bax und Bcl-2 sowie der IAPs Survivin und XIAP. Das anti-apoptotische Bcl-2-Protein Mcl-1 war in seiner Expression nach ASA- (5 mM) und DF- (60 $\mu\text{g/ml}$) Inkubation reduziert (Abbildung 29). Für CTCL-Zellen ist die Expression von c-FLIP von großer Bedeutung.

In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass ASA und DF beide FLIP-Isoformen, c-FLIP_L und c-FLIP_S, in beiden Zelllinien sowie NaS c-FLIP_S in HH herabregulierten (Abbildung 29). Zur Klärung des Einflusses von c-FLIP auf die NSAID-vermittelte Apoptose in CTCL-Zelllinien wurde mittels lentiviraler Vektoren zum einen c-FLIP_L überexprimiert und zum anderen die Expression von c-FLIP mittels spezifischer shRNA herabreguliert.

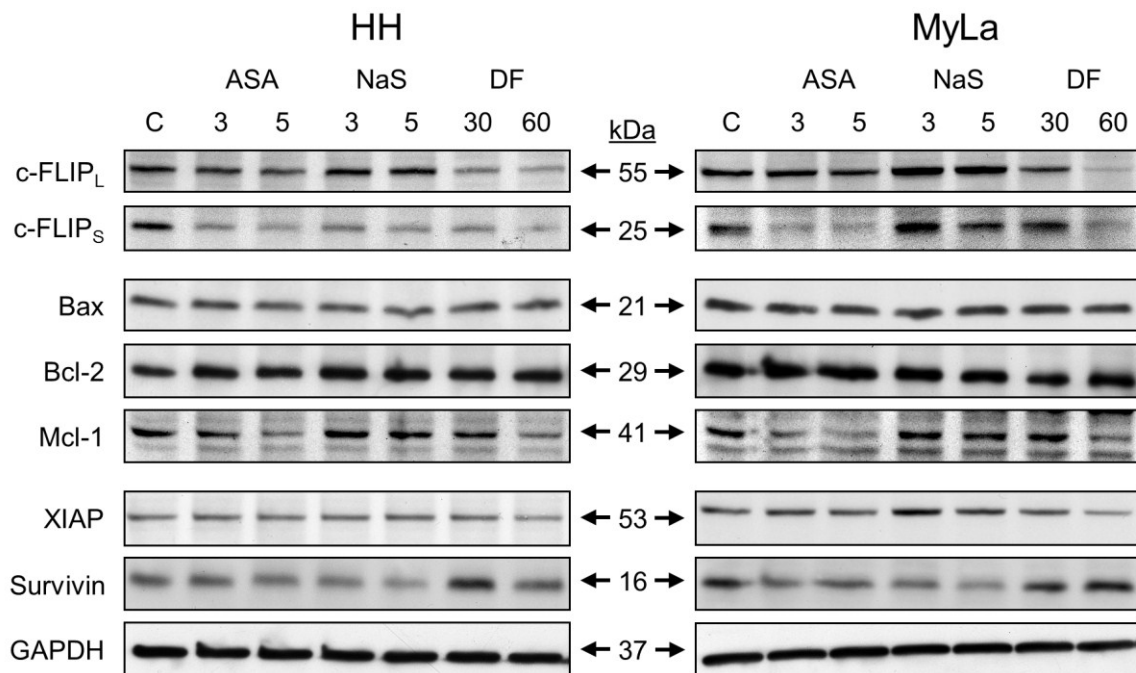


Abbildung 29 Herabregulation von c-FLIP und Mcl-1.

Die Expression der Apoptosemediatoren c-FLIP_{L/S} (*long* und *short*), der Bcl-2-Proteine (Bax, Bcl-2 und Mcl-1) und der IAP-Proteine (XIAP und Survivin) wurde in HH- und MyLa-Zellen nach NSAID-Behandlung mittels Westernblot-Analyse untersucht. Hierfür wurden die Zellen für 24 h mit ASA (3 und 5 mM), NaS (3 und 5 mM) oder mit DF (30 und 60 µg/ml) inkubiert. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. Der gleichmäßige Proteintransfer wurde mittels Ponceau-Färbung und eine gleichmäßige Proteinladung (30 µg/Bahn) mittels GAPDH-Expression als Ladekontrollen bestätigt. Mindestens zwei unabhängige Experimente, mit jeweils vergleichbaren Ergebnissen, wurden durchgeführt.

Zwei unabhängig voneinander mit FLIP_L-Retrovirus-transduzierte und selektierte MyLa-Zellpopulationen wurden mit Mock-transduzierten Kontrollzellen hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber NSAID-induzierter Apoptose verglichen. Die Apoptoseinduktion nach 40 h Inkubation mit ASA (5 mM), NaS (5 mM) oder DF (60 µg/ml) zeigte sich in den FLIP_L-überexprimierenden Zellen als signifikant erniedrigt (Abbildung 30 A), wohingegen die Mock-transduzierten Zellen eine den parentalen Zellen vergleichbare Apoptoseinduktion aufwiesen. Als zusätzliche Kontrolle wurden die Zellen mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH-11 (50 ng/ml, 16 h) inkubiert (Abbildung 30 A).

Die stabile Transduktion wurde mittels GFP-Expression (70-90% GFP) bestätigt (Abbildung 30 B) und die Überexpression von c-FLIP_L mittels Westernblot-Analyse überprüft (Abbildung 30 C). Eine weitere Bestätigung für die zentrale Rolle von c-FLIP für das Überleben und die Apoptoseresistenz von CTCL-Zellen zeigte sich in der deutlichen Apoptoseinduktion in cFLIP^{RNAi}-transduzierten HH- und MyLa-Zellen (Abbildung 30 D).

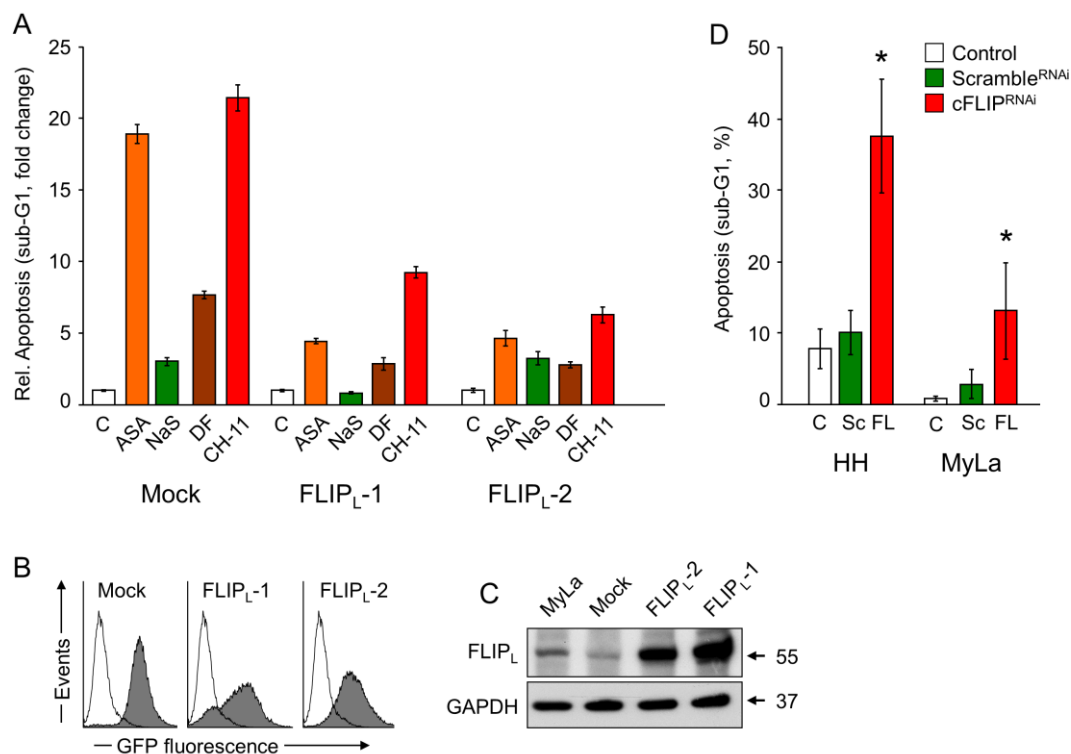


Abbildung 30 Verminderte NSAID-induzierte Apoptose durch c-FLIP_L-Überexpression.

Stabil mit Mock- oder c-FLIP_L-Expressionsvektor transduzierte MyLa-Zellen (zwei unabhängige Ansätze FLIP_L-1/-2) wurden für 40 h mit ASA (5 mM), NaS (5 mM) oder DF (60 µg/ml) sowie mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH-11 (50 ng/ml, 16 h) inkubiert. (A) Die relative Apoptoseinduktion wurde anhand der apoptotischen Sub-G1-Zellpopulationen quantifiziert und auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle normiert (C = 1). Dargestellt sind die Mittelwerte mit ±SD eines repräsentativen, mit Dreifachwerten durchgeführten Experiments. (B) Transduktionseffizienz wurde anhand der GFP-Expression (70-90% GFP⁺) überprüft. Eine Verschiebung nach rechts zeigt eine verstärkte Expression an. (C) Die Überexpression von c-FLIP_L in transduzierten MyLa-Zellen wurde mittels Westernblot-Analyse nachgewiesen. Gleiche Proteinladung (30 µg/Bahn) sowie ein gleichmäßiger Proteintransfer wurde mittels Ponceau-Färbung und GAPDH-Expression bestätigt. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben. Zwei unabhängige Experimente ergaben vergleichbare Ergebnisse. (D) Dargestellt ist die Apoptoseinduktion von unbehandelten, mit cFLIP^{RNAi} (FL)- und Scramble^{RNAi} (Sc)-transduzierte HH- und MyLa-Zellen, bestimmt anhand der durch PI-Färbung identifizierten Sub-G1-Zellpopulation. Gezeigt sind die Mittelwerte mit ±SD von zwei Experimenten, jeweils durchgeführt mit Dreifachwerten. Die Signifikanz wurde mittels Student'sche *t*-Verteilung berechnet und bei einem *p*-Wert von < 0,05 mit [*] gekennzeichnet.

2.15 Sensitivierung für TRAIL-induzierte Apoptose durch Diclofenac

Todesliganden sind für die Selbstkontrolle von Lymphozyten von großer Bedeutung. Daher ist eine mögliche Sensitivierung von CTCL-Zellen für TRAIL-induzierte Apoptose durch NSAIDs von besonderem Interesse. Der Nachweis von TRAIL-Oberflächenexpression erfolgte mittels Durchflußzytometrie in NSAID-behandelten Zellen. Dabei zeigte sich, dass in HH-Zellen im Unterschied zu MyLa-Zellen bereits in unbehandelten Kontrollen TRAIL-Expression nachweisbar war. Des Weiteren zeigte sich, dass in HH-Zellen alle drei NSAIDs zu einer verstärkten TRAIL-Expression führten (Abbildung 31A). Im Gegensatz dazu war in MyLa keine vergleichbare TRAIL-Expression nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Im Zusammenhang mit der ausgeprägten Resistenz von CTCL-Zellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose wurde eine mögliche Sensitivierung für TRAIL durch NSAIDs untersucht. Dabei zeigte sich, dass weder ASA noch NaS für TRAIL sensitivieren. Hingegen konnte die Vorinkubation mit DF beide Zelllinien deutlich für TRAIL-induzierte Apoptose sensitivieren. Die Kombinationsbehandlung bestehend aus DF (60 µg/ml, 24 h) gefolgt von 16 h mit TRAIL (20 ng/ml) führte zu 45% (in HH) und 25% (in MyLa) apoptotischen Zellen (Abbildung 31 B).

Die erhöhte Sensitivität äußerte sich auch in einer verstärkten Aktivierung der Caspasensignalkaskade in DF- und TRAIL-behandelten Zellen. Dies war durch die Zunahme von spezifischen Caspasespaltprodukten (p18 für Caspase-8; p20, p17, p15 für Caspase-3) mittels Westernblot-Analyse nachweisbar. Von besonderer Bedeutung für die TRAIL-Sensitivierung scheint dabei die deutliche Reduktion der c-FLIP-Expression zu sein (Abbildung 31 C).

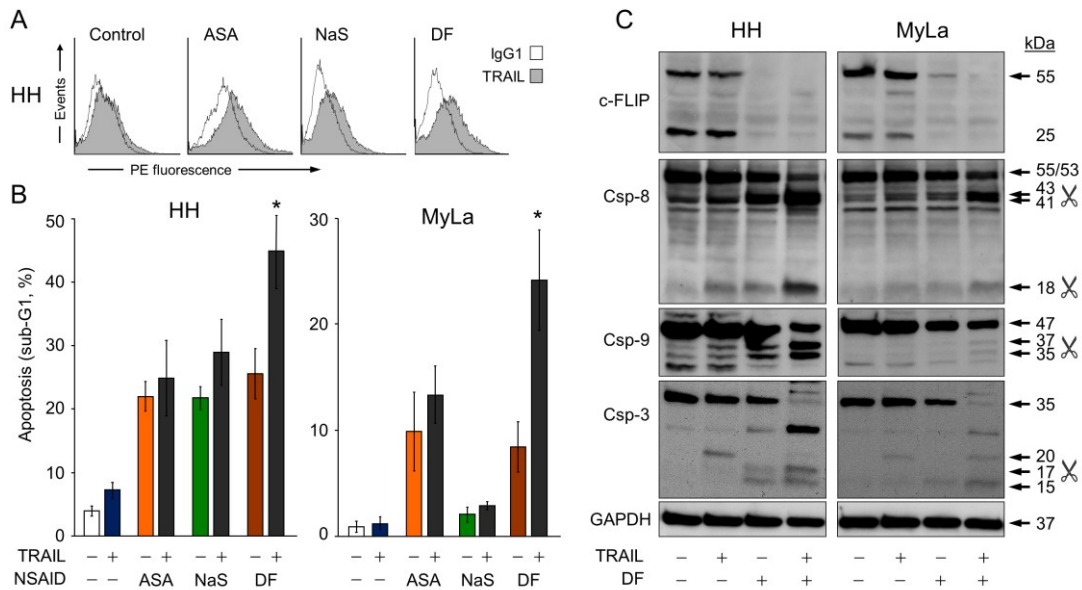


Abbildung 31 Verstärkung der TRAIL-induzierten Apoptose durch Diclofenac.

(A) Die Oberflächenexpression von TRAIL in HH-Zellen, behandelt für 24 h mit ASA (5 mM), NaS (5 mM) und DF (60 µg/ml), wurde mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Die dargestellten Histogramme zeigen NSAID-behandelte Zellen, die mit TRAIL-spezifischem (gefüllte Graphen) und mit Isotypkontrollantikörper (offener Graph) gefärbt wurden. Eine Verschiebung nach rechts zeigt eine verstärkte Expression an. Drei unabhängige Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse. (B) HH- und MyLa-Zellen wurden für 40 h mit ASA (5 mM), NaS (5 mM), DF (60 µg/ml) oder TRAIL (20 ng/ml, 16 h) alleine inkubiert bzw. in der Kombination für 24 h mit NSAIDs vorinkubiert, gefolgt von 16 h mit TRAIL. Die Apoptoseinduktion wurde anhand der durch PI-Färbung quantifizierten Sub-G1-Zellpopulationen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit \pm SD eines repräsentativen, mit Dreifachwerten durchgeführten Experiments. Die Signifikanz wurde mittels Student'sche *t*-Verteilung berechnet und bei einem *p*-Wert von $< 0,05$ mit [*] gekennzeichnet. (C) In parallel geernteten Proteinextrakten von TRAIL- und Diclofenac-behandelten Zellen wurde die Prozessierung von Caspase-8, -9 und -3 sowie von c-FLIP mittels Westernblot-Analyse untersucht. Eine Caspasenaktivierung ist durch die Abnahme der entsprechenden Proform bzw. durch das Auftreten von spezifischen Caspasenspaltprodukten (\times) gezeigt. Der gleichmäßige Proteintransfer wurde mittels Ponceau-Färbung und eine gleichmäßige Proteinladung (30 µg/Bahn) mittels GAPDH-Expression als Ladekontrollen bestätigt. Mindestens zwei unabhängige Experimente, mit jeweils vergleichbaren Ergebnissen, wurden durchgeführt.

2.16 Korrelation der Zelllinien-Daten mit *ex vivo*-Ergebnissen von primären Tumorzellen

Zur Validierung der Zelllinien-Ergebnisse (*in vitro*) wurden Tumor-T-Zellen von Sézary-Syndrom-Patienten hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber NSAID-induzierter Apoptose untersucht und mit der von CD4⁺ T-Zellen gesunder Spender verglichen. Die hierfür isolierten Tumor-T-Zellen und CD4⁺ Kontroll-T-Zellen wurden auf über 90%, entsprechend der tumor-spezifischen TCR β -Umlagerung bzw. der CD4-Expression, angereichert (Daten nicht gezeigt). Beide Zellpopulationen wurden dann für 40 h mit ASA

(5 mM), NaS (5 mM) und DF (60 µg/ml) behandelt. Es zeigte sich eine signifikante Apoptoseinduktion in den isolierten Tumor-T-Zellen aller vier Sézary-Syndrom-Patienten (Abbildung 32, oberes Panel). Eine vergleichbare Apoptoseinduktion war auch in den CD4⁺ T-Zellen von gesunden Spendern nachweisbar. Dies könnte ein Hinweis auf zusätzliche pro-apoptotische, COX-unabhängige Mechanismen sein. Eine Wiederholung der Experimente 2-4 Wochen später mit neuen Isolaten der gleichen Patienten ergab eine vergleichbare Sensitivität (Daten nicht gezeigt). Die parallel, anhand der LDH-Freisetzung bestimmte Zytotoxizität zeigte sich hingegen nicht signifikant erhöht (Abbildung 32, unteres Panel). Die Untersuchungen belegen damit die Wirksamkeit der untersuchten NSAIDs sowohl in Zelllinien (*in vivo*) als auch in Tumor-T-Zellen von CTCL-Patienten (*ex vivo*).

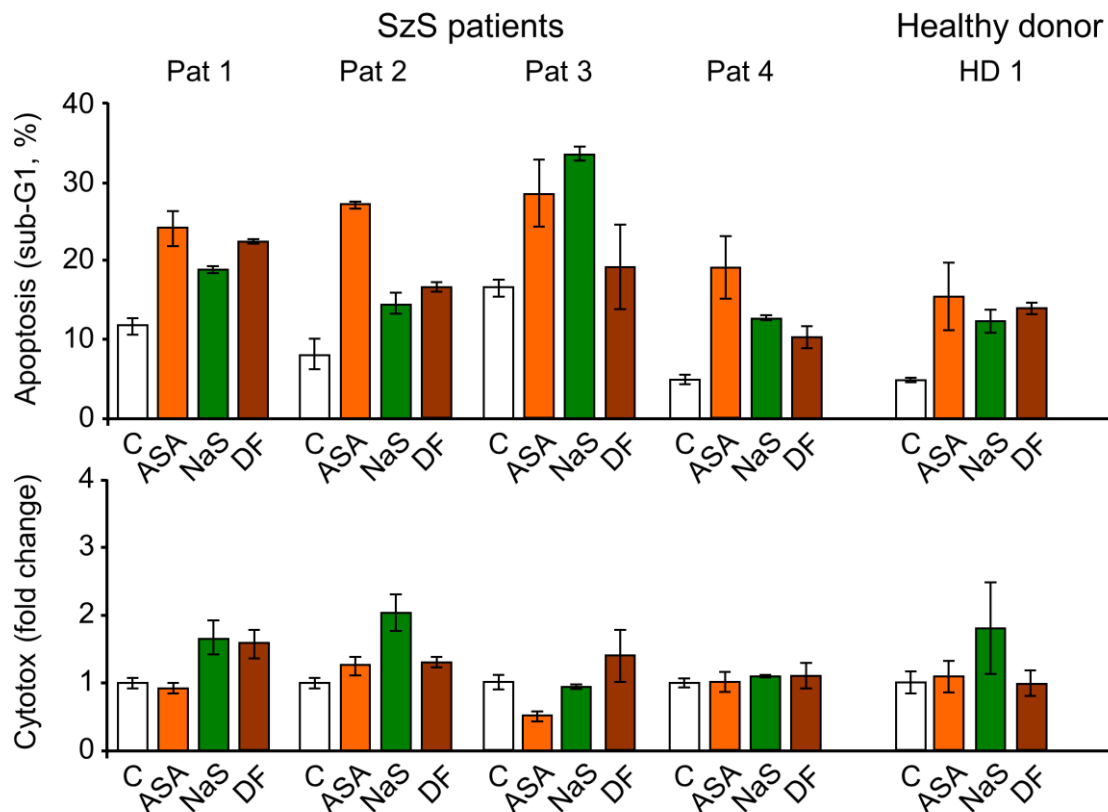


Abbildung 32 NSAID-induzierte Apoptose in Tumor-T-Zellen von CTCL-Patienten.

Isolierte und angereicherte Tumor-T-Zellen von vier Sézary-Syndrom-Patienten (Pat 1-4) bzw. von vier CD4⁺ T-Zellen von gesunden Spendern (HD, einer gezeigt) wurden für 40 h mit ASA (5 mM), NaS (5 mM) oder DF (60 µg/ml) inkubiert und die Apoptoseinduktion anhand der Sub-G1-Zellpopulationen bestimmt (oberes Panel). Relative Zytotoxizität wurde mittels LDH-Freisetzung bestimmt und jeweils auf die unbehandelten Proben normalisiert (C = 1) (unteres Panel). Dargestellt sind Mittelwerte ±SD eines repräsentativen Experimentes, durchgeführt mit Dreifachwerten. Zwei unabhängige Experimente mit jeweils frisch isolierten Tumor-T-Zellen lieferten vergleichbare Ergebnisse. Die Tumorzellen wurden entsprechend der Tumorspezifischen TCRβ-Umlagerung isoliert und die Anreicherung (> 90%) mittels Durchflußzytometrie überprüft.

3 Diskussion

3.1 Bedeutung von Apoptose für Lymphozyten und Krebs

Proapoptotische Signalwege sind ein Sicherheitssystem, das die Entfernung von entarteten Zellen sicherstellt und damit unter anderem der Entstehung von Krebs entgegen wirkt. Damit stellen Apoptosesignalwege einen zentralen Bestandteil der physiologischen Tumorabwehr dar; entsprechend ihrer Bedeutung sind diese Signalwege häufig in Tumorzellen dysreguliert und mit Tumorgenese und Tumorwachstum assoziiert (Fulda, 2009). Die Aktivierung von Apoptosesignalwegen kann durch die Bindung von Todesliganden an entsprechende Todesrezeptoren, durch intrinsische Signale oder auch durch die Sezernierung von Granzym B erfolgen (Russell and Ley, 2002). Für T-Lymphozyten sind Apoptosesignalwege sowohl für die Reifung, Entwicklung als auch für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase von großer Bedeutung. Die im Zuge der T-Zell-Aktivierung erhöhte Lymphozytenzahl wird mittels AICD (*activation-induced cell death*) wieder auf ein physiologisches Niveau reduziert (Li-Weber and Krammer, 2003; Krammer *et al*, 2007). An diesen Prozessen sind Todesliganden wie CD95L, TRAIL und TNF- α maßgeblich beteiligt (Janssen *et al*, 2005; Gupta and Gollapudi, 2005). Die verschiedenen Apoptosemediatoren und Signalwege unterliegen generell einer strikten Kontrolle und ihre Funktionsfähigkeit ist über eine Vielzahl von Querverbindungen sichergestellt.

Apoptosesignalwege und deren Regulationsmechanismen sind in T-Lymphozyten Gegenstand aktueller Forschung, zu der auch die hier vorliegende Arbeit einen Beitrag leistet. Die hierzu durchgeführten Untersuchungen stützen sich dabei auf eine breite und repräsentative Auswahl von zurzeit verfügbaren CTCL-Zelllinien sowie auf Patientenproben, die eine Korrelation zur *in vivo*-Situation ermöglichen. Damit sollten Rückschlüsse auf die Besonderheiten von kutanen Lymphomen auch im Hinblick auf die klinische Situation möglich sein.

3.2 Apoptosesensitivität von CTCL-Zellen

Auf Grund der zentralen Rolle der extrinsischen Apoptosesignalwege für die Zellen des Immunsystems war zunächst die Aktivierbarkeit dieser Signalwege in den kutanen T-Zell-Lymphomzelllinien (CTCL) von Interesse. Hierfür wurden CTCL-Zelllinien (MF/SzS und cALCL) mit histotypisch ähnlichen systemischen T-Zell-Lymphomzelllinien (T-ALL)

(Bassan *et al*, 2004) hinsichtlich ihrer Apoptoseregulation vergleichend untersucht. Dabei zeigte sich, dass alle systemischen T-ALL-Zelllinien gegenüber der Todesliganden-induzierten Apoptose sensitiv waren. Die untersuchten kutanen T-Zell-Lymphomzelllinien (MF/SzS und cALCL) waren bis auf eine Ausnahme, SeAx, ebenfalls für die CD95-induzierte Apoptose sensitiv. Im Unterschied zu den T-ALL-Zelllinien zeichneten sich die kutanen T-Zell-Lymphomzelllinien durch eine deutlich verminderte Sensitivität gegenüber TNF- α - und TRAIL-induzierter Apoptose aus. Im Detail konnte für TNF- α eine nahezu vollständige Apoptoseresistenz und für TRAIL eine deutlich erniedrigte Apoptosesensitivität nachgewiesen werden.

Eine verminderte Sensitivität gegenüber CD95-induzierter Apoptose ist für verschiedene hämatopoetische Tumorentitäten beschrieben (Mathas *et al*, 2004; Peter *et al*, 2005; Oyarzo *et al*, 2006). Apoptoseresistenz gegenüber TNF- α wurde für die Zelllinie HuT-78 gezeigt (Giri and Aggarwal, 1998). Die beschriebene verminderte Zellviabilität für SeAx nach Langzeit-TNF- α -Behandlung kann jedoch, im Hinblick auf die hier vorliegenden Ergebnisse, nicht auf Apoptoseinduktion zurückgeführt werden (Dobbeling *et al*, 1998). Eine Resistenz gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose wurde für verschiedene Non-Hodgkin-Lymphom T-Zell-Zelllinien inklusive HH berichtet (Snell *et al*, 1997; Testa, 2010).

Die hier beschriebenen Untersuchungen sollten Erkenntnisse hinsichtlich der Ursachen der Therapieresistenz von CTCL-Zellen, die in der klinischen Situation häufig zu beobachten sind, liefern (Guitart, 2006). Auf Grund der recht einheitlichen Resistenz gegenüber der TNF- α - und TRAIL-induzierten Apoptose in den verschiedenen untersuchten kutanen Zelllinien scheint die hier beschriebene Apoptoseresistenz eine charakteristische Eigenschaft von CTCL-Zellen zu sein. Hierfür mag auch der Gedächtniszellphänotyp von CTCL-Zellen von Bedeutung sein (Burg *et al*, 2005). Die hier vorgestellten Ergebnisse sind daher vor allem für Therapiestrategien von Bedeutung, die auf der Aktivierung von Apoptosesignalwegen beruhen. Die Aufklärung der Apoptoseresistenzen und die Identifizierung von neuen Zielproteinen kann zur Optimierung dieser Therapieansätze beitragen (Reed and Pellecchia, 2005).

3.3 Aktivierung von Apoptosesignalwegen

In der Apoptose ist die Aktivierung der Caspasen-Signalkaskade von zentraler Bedeutung (Hengartner, 2000). Ein frühes Ereignis im Verlauf der Todesliganden-induzierten Apoptose stellt die Aktivierung der Initiatorcaspase-8 und -10 dar. Für beide

Initiatorcaspasen sind neben gemeinsamen auch spezifische Zielproteine identifiziert worden, was auf unterschiedliche Funktionen hindeutet (Fischer *et al*, 2006). In diesem Zusammenhang ist interessant, dass für die Initiatorcaspase-8, anders als für die Initiatorcaspase-10, eine Aktivierung des überwiegend anti-apoptotischen NF- κ B-Signalweges beschrieben wurde (Su *et al*, 2005; Maelfait and Beyaert, 2008).

Aberrationen, die zur Ausbildung von Apoptoseresistenz beitragen, sind neben der Inaktivierung auch der Verlust von Initiatorcaspasen. Beides konnte für Tumorentitäten wie Lungenkrebszellen (Initiatorcaspase-8) (Hopkins-Donaldson *et al*, 2003) oder Brustkrebszellen (Initiatorcaspase-10) (Kischkel *et al*, 2001) gezeigt werden. Für verschiedene Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) sind überdies inaktivierende Mutationen der Initiatorcaspase-10 berichtet (Shin *et al*, 2002).

In keiner der T-ALL-Zelllinien war eine Aktivierung der Initiatorcaspase-10 durch die eingesetzten Todesliganden nachweisbar. Im Unterschied dazu zeigte sich in den CTCL-Zelllinien eine Aktivierung der Initiatorcaspase-10 nach CD95-Stimulation. In CTCL-Zelllinien scheint daher die Initiatorcaspase-10 auch über die Expression reguliert zu werden. Unsere Untersuchungen zeigten einen Verlust der Initiatorcaspase-10 in zwei der CTCL-Zelllinien bzw. eine schwache aber funktionelle Expression in den verbleibenden sechs CTCL-Zelllinien. Auf Grund der Aktivierbarkeit der Initiatorcaspase-10 kann der Verlust der Expression für die Apoptoseresistenz von Bedeutung sein (Wang *et al*, 1999; Wachmann *et al*, 2010). Eine vergleichbare Regulation der Initiatorcaspase-8 zeigte sich weder in den kutanen noch in den systemischen Zelllinien. Parallel zur Apoptosesensitivität zeigte sich eine Aktivierung der Caspasensignalkaskade durch die eingesetzten Todesliganden. Die fehlende Prozessierung der Initiatorcaspase-8 durch TRAIL und TNF- α in den nicht responsiven Zellen deutet auf eine frühe Blockierung der Apoptose hin.

Bcl-2-Proteine sind nicht nur für die Regulation des mitochondrialen Signalweges von Bedeutung, sondern verbinden über die Initiatorcaspase-8-abhängige Prozessierung von Bid zu tBid (*truncated* Bid) den extrinsischen mit dem intrinsischen Apoptosesignalweg (Li *et al*, 1998; Karst and Li, 2007). Untersuchungen hierzu zeigten in den CTCL-Zelllinien (2/4 MF/SzS Zelllinien und in 3/4 cALCL) einen gehäuftten Verlust des Bcl-2-Proteins Bid. Dieser Verlust ist für die Apoptosesensitivität von Bedeutung, da damit der intrinsische Signalweg nicht mehr für die Verstärkung einer Todesliganden-vermittelten Apoptose zur Verfügung steht.

Insgesamt zeigen die durchgeführten Untersuchungen, dass die Blockierung der Apoptosesignalwege, die mit der Apoptoseresistenz in Zusammenhang stehen, zu einem frühen Zeitpunkt in der Apoptosesignalkaskade erfolgt.

3.4 Expression der Bcl-2-Proteine

Im Allgemeinen wird der intrinsische mitochondriale Apoptosesignalweg durch die Bcl-2-Proteinfamilie reguliert. Die Expression von Bcl-2-Proteinen wie Bax, Bcl-2, Mcl-1 oder Bcl-x_L wurde für kutane MF/SzS- (Dummer *et al*, 1995; Zhang *et al*, 2003a) und für cALCL-Zelllinien (Greisser *et al*, 2005) bereits gezeigt. Jedoch scheinen diese Apoptosemediatoren für die hier beschriebene Resistenz der CTCL-Zelllinien gegenüber der Todesliganden-induzierten Apoptose von geringerer Bedeutung zu sein. Eine korrespondierende Veränderung in der Expression von relevanten Bcl-2-Proteinen, die typischerweise in der Blockierung von Apoptosesignalwegen involviert und mit der Ausprägung von Chemotherapieresistenz assoziiert sind, konnte nicht nachgewiesen werden (Zhang *et al*, 2008). Vielmehr scheinen die Proteine, die an der Regulation des DISC beteiligt sind wie Todesrezeptoren, Initiatorcaspasen, Regulator- und Adapterproteine, von größerer Bedeutung zu sein. Dies kann mit dem Typ I-Zellphänotyp der T-Zellen, bei dem der extrinsische Signalweg wichtiger ist, in Zusammenhang stehen (Barnhart *et al*, 2003).

3.5 Expression von Todesrezeptoren

Der Verlust oder eine zu geringe Expression von Todesrezeptoren kann als Ursache für die Entstehung von Apoptoseresistenz verantwortlich sein. Dies würde zu keiner oder einer verminderten Initialisierung des extrinsischen Apoptosesignales führen und so die Formierung des DISC bzw. die Aktivierung der Initiatorcaspase verhindern. Für verschiedene Tumorentitäten sowie für die Tumorstadien von MF und SzS ist neben dem Verlust von Todesrezeptoren auch das Auftreten von inaktivierenden Mutationen beschrieben (Zoi-Toli *et al*, 2000; Dereure *et al*, 2002; van Doorn *et al*, 2002; Li-Weber and Krammer, 2003; Nagasawa *et al*, 2004).

Für die Zelllinie SeAx konnte der Verlust des Todesrezeptors CD95 mit der Resistenz gegenüber der durch den agonistischen anti-CD95-Antikörper-induzierten Apoptose korreliert werden. Ein Verlust von CD95 wurde auch in CTCL-Patientenproben nachgewiesen (Contassot *et al*, 2008).

Für den Einfluss von TNF- α auf die Apoptoseregulation sind verschiedene Effekte beschrieben, zum einen die Aktivierung von NF- κ B-Signalwegen durch die Bindung von TNF- α an beide TNF-Rezeptoren (TNF-R1 und -R2) und zum anderen die Apoptoseinduktion durch die Aktivierung des TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1). Im Zuge der Bindung von TNF- α an den TNF-R1 kommt es über die Anlagerung von Adapterproteinen und Initiatorcaspasen an der intrazellulären Todesdomäne zur Aktivierung des extrinsischen Apoptosesignalweges. Auch ist TNF- α in der Herabregulation von CD4⁺- und CD8⁺-vermittelten Immunantworten involviert (Gupta and Gollapudi, 2005).

Die hier beschriebene Resistenz der CTCL-Zellen gegenüber TNF- α -induzierter Apoptose könnte mit dem gehäuften Verlust des Todesrezeptors TNF-R1 in sechs der acht CTCL-Zelllinien (MF/SzS und cALCL) in Zusammenhang stehen. Im klaren Kontrast dazu zeigten alle systemischen T-ALL-Zelllinien eine deutliche Expression von TNF-R1 sowie eine signifikante Apoptoseinduktion nach TNF- α -Stimulation. Als Folge des Verlustes von TNF-R1 kann die Stimulation mit TNF- α zu einer Aktivierung der NF- κ B-Signalwege durch die Bindung von TNF- α an den TNF-Rezeptor 2 führen. In diesem Fall würde nicht nur die Apoptoseinduktion blockiert sein, sondern auch gleichzeitig ein starker anti-apoptotischer Signalweg aktiviert werden. Dass CTCL-Zellen TNF-R2 exprimieren, zeigt sich durch den Nachweis von löslichem sTNF-R2 im Serum von CTCL-Patienten (Goto *et al*, 2006). Der gehäufte Verlust des TNF-R1 kann auf eine besondere Bedeutung von TNF- α -vermittelter Apoptose in der Pathogenese von CTCL-Zellen hinweisen. Ein Verlust, beziehungsweise eine verminderte Expression des TNF-R1 wurde bislang nicht als möglicher Resistenzmechanismus für TNF- α beschrieben. Die hier vorliegenden Ergebnisse legen dies für CTCL-Zellen nahe.

Die TRAIL-vermittelte Apoptose ist auch in der Modulation der Immunantwort von Bedeutung. Hierzu konnte gezeigt werden, dass aktivierte CD4⁺ Th₂ T-Helferzellen (Zhang *et al*, 2003b) ebenso wie CD8⁺ T-Lymphozyten (Janssen *et al*, 2005) TRAIL exprimieren. Die gezeigte charakteristische Apoptoseresistenz der CTCL-Zelllinien gegenüber TRAIL konnte nicht mit einer verminderten oder fehlenden Todesrezeptorexpression (TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5) korreliert werden.

Im Zusammenhang mit TRAIL-Resistenz kann auch die Expression von sogenannten TRAIL-Decoy-Rezeptoren relevant sein. Diese Rezeptoren sind zwar grundsätzlich zu einer Bindung von TRAIL fähig, verfügen jedoch über keine funktionelle intrazelluläre Todesdomäne, die für die Aktivierung der Apoptosesignalwege notwendig ist. Untersuchungen hierzu konnten jedoch auch eine verstärkte Expression von TRAIL-

Decoy-Rezeptoren (DcR1, DcR2) als Ursache ausschließen. Daher ist die Apoptoseresistenz möglicherweise in der Expression von Caspasen-Inhibitoren begründet.

3.6 Expression des Caspasen-Inhibitors c-FLIP

Die Expression des kompetitiven Caspasen-Inhibitors c-FLIP blockiert die Aktivierung der Initiatorcaspasen durch deren Verdrängung aus dem DISC. Dadurch vermindert sich die Menge an katalytisch aktiver Initiatorcaspasen, was zur Modulation von extrinsischen Apoptosesignalen führt. Die zentrale Bedeutung von c-FLIP für die Resistenz gegenüber CD95-induzierter Apoptose ist für Hodgkin-Lymphome (Mathas *et al*, 2004) und für Non-Hodgkin-Lymphome (Oyarzo *et al*, 2006; Braun *et al*, 2007; Braun *et al*, 2010) beschrieben. Dieser Inhibitor könnte die Ursache für die verminderte Sensitivität gegenüber der Todesliganden-vermittelten Apoptose sowie der hier gezeigten Blockierung der Initiatorcaspase-8-Aktivierung sein (Bagnoli *et al*, 2010).

In der Tat ist der bedeutendste Unterschied zwischen den apoptoseresistenten CTCL-Zelllinien und den apoptosesensitiven T-ALL-Zelllinien die Expression von c-FLIP. In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine starke Expression von c-FLIP_L und c-FLIP_S in allen acht untersuchten kutanen CTCL-Zelllinien (MF/SzS und cALCL) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte in keiner der vier systemischen T-ALL-Zelllinien eine signifikante c-FLIP-Expression gefunden werden. Die Rolle von c-FLIP stärkend zeigte sich in Tumorzellen von Patienten mit MF/SzS (Abbildung 20) (Braun *et al*, 2007; Contassot *et al*, 2008) und cALCL (Abbildung 25) (Braun *et al*, 2010) eine erhöhte Expression von c-FLIP im Vergleich zu reaktiven Lymphozyten. Dies könnte daher als ein charakteristisches Merkmal von kutanen T-Zell-Lymphomzellen gewertet werden.

Bekanntermaßen handelt es sich bei c-FLIP um ein sogenanntes NF- κ B-Zielprotein, dessen Expression von der Aktivierung der NF- κ B-Signalwege abhängig ist. Korrespondierend dazu konnte sowohl in Hodgkin-Reed-Steinberg-Zellen (Mathas *et al*, 2004) als auch in CTCL-Zellen (Sors *et al*, 2006) eine konstitutive NF- κ B-Aktivierung nachgewiesen werden. Die Bedeutung von c-FLIP als Apoptoseresistenzfaktor zeigt sich auch in der Suche nach therapeutisch relevanten Strategien zur Modulation der c-FLIP-Expression (Safa *et al*, 2008).

3.7 Einfluss von CD30-Signalgebung auf die Apoptoseregulation

Im folgenden Abschnitt soll nun der Einfluss der CD30-Signalgebung auf die Apoptoseregulation einer CD30-positiven NHL-Entität, dem kutanen anaplastischen

großzelligen T-Zell-Lymphom (cALCL), eingehender diskutiert werden. Die starke Expression von CD30 stellt ein Charakteristikum für diese Non-Hodgkin-Lymphomentität dar. Die selektive Expression von CD30 findet daher nicht nur Anwendung in der Diagnostik, sondern stellt darüber hinaus ein vielversprechendes Ziel für gerichtete Therapiestrategien dar.

Im Allgemeinen tragen kostimulatorische Signale zur Modulation von verschiedenen Signalwegen bei. Das CD30-Rezeptor/Ligand-System stellt für T-Zellen ein solches kostimulatorisches Signal dar. Der Einfluss der CD30-Signalgebung auf die Apoptoseregulation in Hodgkin-Zellen, in systemischen ALCL bzw. in aktivierten T-Zellen wird, aufgrund des breiten Spektrums an Effekten, kontrovers diskutiert (Kennedy *et al*, 2006). Die Komplexität der CD30-Signalgebung dürfte mit der Aktivierung von Signalwegen wie dem NF- κ B- oder auch dem MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalweg in Zusammenhang stehen. So wurde unter anderem die Arretierung des Zellzyklus in ALCL-Zellen nach CD30-Stimulation berichtet (Levi *et al*, 2000; Wright *et al*, 2007). Die Ambivalenz von CD30-Stimulation zeigte sich auch in Untersuchungen, in denen mittels cDNS-Microarray-Analysen die Hochregulation von pro- und anti-apoptotischen Faktoren gefunden wurde (Mir *et al*, 2000; Hubinger *et al*, 2004; Staber *et al*, 2006; Hirsch *et al*, 2008). Obwohl die Aktivierung von NF- κ B-Signalwegen durch CD30 anerkannt ist und in systemischen ALCL-Zellen nachgewiesen werden konnte, zeigte sich in Hodgkin-Zellen keine vergleichbare NF- κ B-Aktivierung. Dies könnte mit der in Hodgkin-Zellen bereits starken konstitutiven NF- κ B-Aktivierung in Zusammenhang stehen (Wright *et al*, 2007; Hirsch *et al*, 2008).

3.8 Apoptoseresistenz durch CD30-Stimulation

In den hier vorgestellten Untersuchungen zur Wechselwirkung von CD30-Signalgebung und Todesliganden-vermittelter Apoptose in kutanen ALCL-Zelllinien zeigte sich für CD30-Stimulation eine durchweg anti-apoptotische Wirkung. Die Aktivierung von CD30 senkte nicht nur die basale Apoptoserate, sondern vermittelte auch eine Resistenz gegenüber CD95-induzierter Apoptose. Eingehende Untersuchungen zur Aktivierung der Caspasensignalkaskade zeigten, dass die CD30-vermittelte Blockierung der Apoptose mit einer verminderten Aktivierung der Initiatorcaspase-8 einhergeht. Dies lässt auf eine frühe Blockierung der Apoptose, wie sie bereits für die TRAIL-Resistenz gezeigt wurde, schließen.

Auf Grund der bisherigen Untersuchungen zur Apoptoseresistenz in CTCL-Zellen scheint auch im Falle der CD30-vermittelten Blockierung der Apoptose NF- κ B von Bedeutung zu sein. Eine Beteiligung von NF- κ B-Zielproteinen in der Tumorprogression, Metastasierung und Chemoresistenz ist für verschiedenste Zellen nachgewiesen (Karin, 2006b; Karin, 2009). In systemischen ALCL-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Blockierung von NF- κ B eine Voraussetzung ist, damit CD30-Stimulation zur Induktion von Apoptose führt (Hubinger *et al*, 2004; Wright *et al*, 2007; Hirsch *et al*, 2008). Eine konstitutive Aktivierung von NF- κ B wie sie für MF/SzS-Zelllinien (Sors *et al*, 2006) gezeigt wurde, könnte auch in cALCL-Zellen vorliegen. Die Expression von c-FLIP als bekanntem NF- κ B-Zielprotein legt dies nahe.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte ein klarer Zusammenhang zwischen CD30-vermittelter Aktivierung von NF- κ B und einer Resistenz gegenüber der CD95-induzierten Apoptose durch die Hochregulation von c-FLIP hergestellt werden. In Übereinstimmung damit führte die Herabregulation von c-FLIP mittels spezifischer RNAi zu einer Re-Sensitivierung der cALCL-Zelllinien für CD95-induzierte Apoptose.

Daraus ergibt sich, dass die Apoptoseinduktion durch einen vergleichsweise starken pro-apoptotischen Stimulus, wie die CD95-Aktivierung, durch Basal-Level von c-FLIP nicht blockiert werden kann. Eine verminderte Sensitivität gegenüber CD95-induzierter Apoptose tritt indes bei einer signifikanten Erhöhung des c-FLIP-Levels, zum Beispiel durch CD30-Stimulation, ein. Die Bedeutung von c-FLIP für das Überleben der CTCL-Zellen im Allgemeinen zeigte sich auch in der Tatsache, dass es nicht möglich war, CTCL-Zellen ohne c-FLIP-Expression dauerhaft in Kultur zu halten – ein Befund, der konform ist mit c-FLIP-defizienten Mausmodellen (Yeh *et al*, 2000).

3.9 Parallelität der *in vitro*-Ergebnisse mit der *in vivo*-Situation

Generell ist eine Korrelation von auf Zelllinien basierenden *in vitro*-Befunden zur deutlich komplexeren *in vivo*-Situation in Patienten schwierig. Dennoch stellen die durchgeführten Untersuchungen an Zellkulturmodellen einen ersten wichtigen Schritt hin zu einem besseren Verständnis der Tumorbilogie dar und sind als solche nach wie vor das gängigste Modell (Levi *et al*, 2000). Für das kutane CD30-positive großzellige T-Zell-Lymphom (cALCL) sind vor allem im indolenten Stadium spontane Regressionen mit ungeklärter Ursache beschrieben. Jedoch ist beim Auftreten von extrakutaner Beteiligung und in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung die Prognose deutlich verschlechtert. Gerade für diese Phasen der Erkrankung stellen die verwendeten Zelllinien ein adäquates

Modell dar. Einsichten in die Ursachen, die zu spontaner Regression führen, sind natürlich von besonderem Interesse und möglicherweise haben die hier identifizierten anti-apoptotischen Mediatoren auch dort einen Einfluss.

Die klinische Bedeutung der identifizierten Apoptosemediatoren zeigt sich in der weitgehenden Parallelität von immunhistologischen Färbungen von CTCL-Patientenbiopsien und den *in vitro*-Ergebnissen. In den Tumorzellen von CTCL-Patientenproben konnte eine erhöhte Expression von c-FLIP sowie eine verminderte Expression von Bid nachgewiesen werden.

Die hier vorgestellten Ergebnisse deuten auf eine charakteristische Resistenz von MF/SzS und CD30-positiven Lymphomzellen gegenüber TRAIL- und TNF- α -induzierter Apoptose hin, die mit deren Pathogenese in Zusammenhang stehen könnte. Weiterführende Untersuchungen zu den komplex regulierten Apoptosesignalwegen in CTCL-Zellen werden letztendlich zu einer Verbesserung der Therapiestrategien führen. In den frühen Stadien von kutanen T-Zell-Lymphomen stehen auf die Haut beschränkte Therapieoptionen mit geringen Nebenwirkungen zur Verfügung (Mestel *et al*, 2008). Kombinationsansätze sowie experimentelle Behandlungen werden zunächst auf eine kleinere Gruppe von Patienten mit aggressiv verlaufenden und therapieresistenten Krankheitsverläufen beschränkt bleiben. Vor allem aber in dieser Gruppe besteht ein Bedarf an wirksameren Therapien, was mit der Identifizierung neuer therapeutisch relevanter Ziele, wie z.B. den hier beschriebenen, unterstützt wird.

3.10 Aktuelle Therapiestrategien für CTCL

Ausgehend von den aktuellen Erkenntnissen zur Apoptoseregulation sowie der gefundenen Apoptoseresistenz in CTCL-Zellen sollen im folgenden Abschnitt mögliche Therapiestrategien erörtert werden. Die Untersuchungen der Apoptosesignalwege sowie die Charakterisierung der Apoptoseresistenzfaktoren ist eine zwingende Voraussetzung für die Entwicklung und Optimierung von Therapiestrategien, welche die Aktivierung von Apoptosesignalwegen zum Ziel haben (Reed and Pellecchia, 2005; Eberle *et al*, 2007a). Die Todesliganden-vermittelte Apoptose ist für die Selbstkontrolle des Immunsystems von Bedeutung und eine Wiederherstellung der Sensitivität gegenüber TRAIL- und TNF- α -induzierter Apoptose könnte einen wichtigen physiologischen Schutzmechanismus in malignen T-Zellen wieder instand setzen.

3.11 Therapeutische Strategien mittels CD95

Wenn auch der Verlust von CD95 in den Zelllinien nicht so häufig ist wie in CTCL-Patientenbiopsien, so stellt die Aktivierung dieses Rezeptors ein interessantes Ziel dar. Jedoch ist vor allem die berichtete Lebertoxizität von CD95L ein Hindernis für die klinische Anwendung (Ogasawara *et al*, 1993; Ashkenazi, 2002). Aktuell werden Todesligandkonstrukte auch gegen CD95 konzipiert und in Studien auf ihre Verträglichkeit hin untersucht (Wajant *et al*, 2011). Neben gentherapeutischen adenoviralen Ansätzen (Fecker *et al*, 2010a) werden auch pharmakologische Substanzen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, CD95-abhängig Apoptose zu induzieren (Rishi *et al*, 2009). Letztendlich müssen diese Ansätze erst ihre Wirksamkeit und Verträglichkeit nachweisen, bevor sie als weitere Therapieoptionen in Frage kommen.

3.12 Therapeutische Strategie mittels TNF-R1 Re-Expression

Neben CD95L und TRAIL ist auch TNF- α für die Selbstregulation von Lymphozyten wichtig (Gupta and Gollapudi, 2005). Auf Grund des gehäuften Verlustes von TNF-R1 in CTCL-Zellen könnte dessen Re-Expression eine neue therapeutische Strategie darstellen. Von Vitamin D3, Dopamin und Serin-Protease-Inhibitoren ist berichtet, dass sie zu einer Re-Expression von TNF-Rezeptoren führen (Mathiasen *et al*, 2001; Gomez-Santos *et al*, 2007; Uwagawa *et al*, 2007). Auf der anderen Seite ist der therapeutische Einsatz von TNF- α im Allgemeinen durch die Induktion von Entzündungsprozessen erheblich eingeschränkt (Ashkenazi, 2002).

3.13 CD30-vermittelte Therapiestrategien

Als charakteristischer Marker von CD30-positiven Lymphomen ist CD30 für gerichtete Therapiestrategien von großem Interesse. Die auf CD30-Antikörpern basierenden therapeutischen Konzepte, die zur Behandlung von CD30-positiven Lymphomen eingesetzt wurden, ergaben bisher eher ernüchternde Ergebnisse. Immunotoxin-gekoppelte agonistische anti-CD30-Antikörper, die in klinischen Studien hinsichtlich ihrer Wirksamkeit untersucht wurden, zeigten hingegen erste vielversprechende Resultate (Fanale and Younes, 2007; Braschoss *et al*, 2007; Foyil and Bartlett, 2010). Auf Grund der hier vorgestellten Ergebnisse erscheinen anti-CD30-Ansätze, die nur auf die Aktivierung des CD30-Signalweges ausgerichtet sind, als ungeeignet. Mehr Erfolg sollten Kombinationen mit Substanzen haben, die zu einer Blockierung von NF- κ B führen, ein

Ansatz, der sich in Untersuchungen an sALCL- und cHL-Zelllinien bereits als erfolgreich erwies (Boll *et al*, 2005; Hirsch *et al*, 2008).

3.14 TRAIL-basierte Therapiestrategien

Unter den Todesliganden stellt TRAIL einen Hoffnungsträger für die Krebstherapie dar und dies vor allem wegen seiner Präferenz, Apoptose in Tumorzellen zu induzieren (Shankar *et al*, 2005b; Newsom-Davis *et al*, 2009). In Studien wurde der Einsatz von TRAIL sowohl alleine (Monotherapie) als auch in Kombination mit anderen Chemotherapeutika in fortgeschrittenen soliden und auch in hämatologischen Tumoren untersucht (Ashkenazi, 2002; Pukac *et al*, 2005; Fischer and Schulze-Osthoff, 2005; Newsom-Davis *et al*, 2009; Testa, 2010). Dabei zeigte sich in verschiedenen systemischen Non-Hodgkin-Lymphomen (Snell *et al*, 1997; MacFarlane, 2009; Testa, 2010) eine Resistenz gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose, die mit den hier vorgestellten Ergebnissen zu kutanen Non-Hodgkin-Lymphomen konform sind. Die Überwindung der TRAIL-Resistenzen in kutanen NHL stellt damit einen wichtigen Punkt in der Etablierung und Optimierung von aktuell verwendeten Therapiestrategien dar. Hierfür scheint die Kombination von TRAIL mit Chemotherapeutika oder Substanzen, die für TRAIL sensitivieren, ein vielversprechender Ansatz zu sein. Eine solche Sensitivierung wurde für verschiedene Chemotherapeutika, für Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) und auch für nicht-steroidale anti-inflammatorische Substanzen (NSAIDs) berichtet (Kruyt, 2008; Fulda, 2008; Fecker *et al*, 2010b).

3.15 HDACi

Histondeacetylase-Inhibitoren wie SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*) zeigten in Kombination mit TRAIL bereits erste positive Befunde in der Therapie von Brustkrebs, Prostatakarzinom oder auch Lymphomen (Inoue *et al*, 2004; Butler *et al*, 2006; Lakshmikanthan *et al*, 2006). In Lymphomzellen konnte die Wirkung von SAHA mit der Hochregulation von Todesrezeptoren, pro-apoptotischen Bcl-2-Proteinen sowie mit der Herabregulation von c-FLIP in Verbindung gebracht werden (Shankar *et al*, 2005a). Vor allem in Lymphomen zeigte die Kombination von SAHA mit Taxol eine verbesserte Wirksamkeit, möglicherweise durch die verminderte Expression von c-FLIP (Shankar *et al*, 2005a; Day *et al*, 2006). Interessanterweise gibt es eine breite Überschneidung in den Apoptosemediatoren, die durch SAHA verändert werden und denen, die in der hier vorgestellten Arbeit mit der Apoptoseresistenz in kutanen CTCL-Zellen in Verbindung

gebracht werden. Zurzeit ist aus der Gruppe der HDACi einzig SAHA (Vorinostat) in den USA für die Behandlung von kutanen T-Zell-Lymphomen zugelassen. Allerdings befinden sich weitere Substanzen mit ähnlichem Wirkungsspektrum in verschiedenen klinischen Studien (Duvic and Vu, 2007).

3.16 NF- κ B-Inhibitoren

Eine weitere Gruppe von Substanzen, die für die Überwindung der hier beschriebenen Apoptoseresistenz von CTCL-Zellen geeignet erscheint, sind die sogenannten Proteasom-Inhibitoren wie zum Beispiel Bortezomib. Die wichtigste Wirkung von Proteasom-Inhibitoren stellt in diesem Zusammenhang die Blockierung der NF- κ B-Signalwege dar, deren Aktivität auch Einfluss auf die Expression des Caspasen-Inhibitors c-FLIP hat. Die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren könnte durch die Herabregulation von c-FLIP die extrinsischen Apoptosesignalwege für TRAIL-vermittelte Apoptose zugänglich machen. Dass dies grundsätzlich funktioniert, konnte bereits in Lymphomen nachgewiesen werden (Georgakis *et al*, 2005). In klinischen Studien wurde die Wirkung von Bortezomib als Mono- und Kombinationstherapie für Myelome, Non-Hodgkin-Lymphome und solide Tumore umfangreich evaluiert und wird aktuell in der CTCL-Therapie eingesetzt (Richardson *et al*, 2006; Mestel *et al*, 2008).

3.17 Interferon und Retinoide

Immunmodulierende Zytokine wie Interferon- α , - γ (IFN- α , IFN- γ) oder Retinoide wie Bexaroten, die beide Standard-Präparate in der Therapie von CTCL sind (Assaf *et al*, 2006; Mestel *et al*, 2008), haben in Myelomen und Lymphomen gezeigt, dass sie zur Hochregulation von TRAIL führen (Gomez-Benito *et al*, 2005; Oehadian *et al*, 2005; Yanase *et al*, 2005). Auf Grund der hier vorgestellten Ergebnisse wäre eine Kombination von Interferon- α oder Bexaroten mit Substanzen, die für die TRAIL-vermittelte Apoptose sensitivieren, interessant.

3.18 Evaluierung der anti-tumoralen Eigenschaften von NSAIDs

Im abschließenden Teil der Arbeit stand die Evaluierung von nicht-steroidalen anti-inflammatorischen Substanzen (NSAIDs) hinsichtlich ihres anti-neoplastischen Potentials im Mittelpunkt. NSAIDs sind seit Jahren in klinischer Anwendung und werden dort zur Behandlung von Schmerzen und Entzündungen eingesetzt. In den hier durchgeführten

Untersuchungen war vor allem die Apoptoseinduktion sowie die Sensitivierung von CTCL-Zellen für die Todesliganden (TRAIL)-induzierte Apoptose von Interesse.

Für die antientzündliche und schmerzlindernde Wirkung von NSAIDs ist vor allem die Blockierung von Cyclooxygenasen (COX-1, COX-2) von Bedeutung. Cyclooxygenasen sind maßgeblich an der Synthese von Prostaglandinen beteiligt. Die Überexpression der COX-2 in Tumorzellen ist aufgrund der anti-apoptotischen Wirkung auch mit der malignen Transformation von Zellen assoziiert (Greenhough *et al*, 2009).

Zunächst konnte im Rahmen von epidemiologischen Studien nachgewiesen werden, dass die Langzeiteinnahme von ASA (Acetylsalicylsäure) zu einem reduzierten Risiko führt, Kolonkarzinome zu entwickeln (Smalley and DuBois, 1997). Für eine Gruppe von Patienten mit FAP (Familiäre Adenomatöse Polyposis), die ein besonders hohes Risiko haben, Kolonkarzinom zu entwickeln, zeigten NSAIDs sogar chemopräventives Potential (Cole *et al*, 2009). Auch sind für NSAIDs COX-unabhängige Effekte beschrieben, die die Expression von c-FLIP beeinflussen (Fecker *et al*, 2007; Jana, 2008).

Genaue Daten hinsichtlich der Wirkung von NSAIDs in T-Zell-Lymphomen sind jedoch nach wie vor rar. Kürzlich konnte die Expression von COX-2 auch in CTCL-Zellen nachgewiesen werden und deren Blockierung durch einen COX-2-selektiven Inhibitor (Celecoxib) mit vermindertem Zellwachstum und Zellvitalität sowie einer Reduktion des Prostaglandin E₂ (PGE₂)-Levels korreliert werden (Kopp *et al*, 2010).

Die Entwicklung von COX-2-selektiven Inhibitoren wie Celecoxib zielte darauf ab, die Nebenwirkungen, insbesondere auf den Magen, von nicht-selektiven COX-Inhibitoren zu umgehen (Warner *et al*, 1999). Im Zuge von klinischen Studien zeigte sich jedoch, dass selektive COX-Inhibitoren das Risiko für Herzinfarkt erhöhen, was sogar zur Rücknahme von verschiedenen Medikamenten dieser Substanzgruppe wie Valdecoxib (Vioxx®) und Rofecoxib (Bextra®) führte (Bresalier *et al*, 2005; Nussmeier *et al*, 2005). Bei den hier eingesetzten NSAIDs handelt es sich um die nicht-selektiven COX-Inhibitoren Acetylsalicylsäure, Natriumsalicylat und Diclofenac. Diese besitzen auf Grund ihrer jahrelangen klinischen Anwendung ein gut untersuchtes Nebenwirkungsprofil.

3.19 Apoptoseinduktion durch NSAIDs in CTCL-Zellen

Die Behandlung von CTCL-Zelllinien mit den hier verwendeten nicht-selektiven NSAIDs führte zu einer starken und dosisabhängigen Verminderung der Zellvitalität. Eine vergleichbare Wirkung ist für den COX-Inhibitor Sulindac in CTCL-Zelllinien beschrieben (Zhang *et al*, 2003a). Zusätzlich zu diesen Befunden konnte in der hier

vorgestellten Arbeit die Involvierung und Bedeutung von Apoptosesignalwegen für die NSAID-medierte Effekte nachgewiesen werden.

Es konnte hier gezeigt werden, dass NSAIDs in CTCL-Zellen Apoptosesignalwege aktivieren. Diese stellen ein zentrales Element in der Apoptose dar. Im Detail war die Initiatorcaspase-8 und Effektorcaspase-3 in NSAID-behandelten Zellen prozessiert, was auf die Aktivierung des extrinsischen Apoptosesignalweges hinweist. Unter bestimmten Bedingungen war die NSAID-induzierte Apoptose jedoch nur partiell blockierbar, was auf die Aktivierung von Caspasen-unabhängigen proapoptotischen Signalwegen hindeutet. Obwohl solche Signalwege in Krebszellen von Bedeutung sein können, sind diese zum Teil noch unzureichend verstanden (Franke *et al*, 2010).

In der systemischen T-Zelllymphom-Zelllinie Jurkat konnten die Celecoxib-medierte pro-apoptotische Effekte mit einer Bak-abhängigen Aktivierung des mitochondrialen Signalweges korreliert werden. Des Weiteren zeigte sich dort eine besondere Abhängigkeit vom Apoptosom (Caspase-9 und Apaf-1) sowie ein Ausschluss der Beteiligung des extrinsischen Signalweges (Jendrossek *et al*, 2003). Auch in den hier untersuchten CTCL-Zellen konnte eine Involvierung der Mitochondrien anhand der deutlichen Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) durch die meisten NSAIDs sowie eine Translokation von Bax und eine Cytochrom C-Freisetzung in Diclofenac-behandelten MyLa-Zellen nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass in HH-Zellen keine Freisetzung von Cytochrom C oder eine mitochondriale Translokation von Bax durch Diclofenac nachgewiesen werden konnte, kann auf eine besondere Bedeutung von Bid hinweisen (Braun *et al*, 2007; Braun *et al*, 2010). Insgesamt scheint der extrinsische Apoptosesignalweg für die NSAID-induzierte Apoptose in CTCL-Zellen von größerer Bedeutung zu sein.

Der mitochondriale Apoptosesignalweg wird maßgeblich durch pro- und anti-apoptotische Bcl-2-Proteine reguliert. Die Expression des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 ist sowohl für hämatologische Tumoren als auch für CTCL-Zellen beschrieben (Zhang *et al*, 2003a; Thomas *et al*, 2010). Eine Herabregulation von Mcl-1, wie sie hier in NSAID-behandelten CTCL-Zellen beschrieben ist, kann zu einer Aktivierung des mitochondrialen Signalweges beitragen. Jedoch zeigte sich, dass Mcl-1 auch unter Bedingungen, in denen keine Freisetzung von Cytochrom C nachweisbar war, in der Expression verändert war und erscheint daher in CTCL-Zellen als nicht ausreichend für eine Aktivierung des mitochondrialen Signalweges.

Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials kann überdies mit einer Entkopplung der Elektronentransportkette in Zusammenhang stehen. Eine solche Wirkung konnte für verschiedene NSAIDs gezeigt werden und ist nicht notwendigerweise mit einer Freisetzung von Cytochrom C verbunden (Chan *et al*, 2005). Insgesamt scheint daher der mitochondriale Apoptosesignalweg, obgleich einer schwachen Aktivierung der Caspase-9 in NSAID-behandelten CTCL-Zellen, von untergeordneter Bedeutung zu sein.

3.20 c-FLIP als Zielmolekül mit zentraler Bedeutung für die Apoptose

Die bedeutende Rolle von c-FLIP für die Apoptoseresistenz von CTCL-Zellen ist bereits beschrieben worden (Braun *et al*, 2007; Braun *et al*, 2010) und auf Grund seiner anti-apoptotischen Eigenschaften ist c-FLIP ein therapeutisch relevantes Zielprotein (Safa *et al*, 2008). Daher ist die hier gezeigte Herabregulation von c-FLIP durch alle NSAIDs von besonderem Interesse. Für Diclofenac wurde eine vergleichbare Wirkung auf die Expression von c-FLIP für kutane Plattenepithelkarzinomzellen (SCC) gezeigt (Fecker *et al*, 2010b).

Eine weitere Bestätigung der Bedeutung von c-FLIP sowohl für das Überleben der CTCL-Zellen als auch für die NSAID-induzierte Apoptose wurde mittels lentiviralen Überexpressions- und shRNA-Ansätzen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Überexpression von c-FLIP_L in MyLa-Zellen zu einer Blockierung der NSAID-induzierten Apoptose führte. Eine Herabregulation von c-FLIP mittels eines RNAi-Ansatzes hingegen induzierte Apoptose in CTCL-Zellen. Beide Ansätze belegen die zentrale Bedeutung von c-FLIP für das Überleben von CTCL-Zellen und geben überdies einen Hinweis auf den pro-apoptotischen Wirkmechanismus von NSAIDs.

Generell können verschiedene Überlebenssignalwege wie MAPKs, PI3K/AKT oder auch der NF- κ B-Signalweg durch COX-2 aktiviert werden (Wang and DuBois, 2006). C-FLIP ist als NF- κ B-Zielprotein beschrieben (Micheau *et al*, 2001) und dessen Herabregulation durch NSAIDs könnte auch mit COX-unabhängigen Effekten, die auf der direkten Blockierung von NF- κ B beruhen, in Zusammenhang stehen. Für Salicylate konnte eine direkte Bindung an den IKK (*I- κ B kinase complex*)-Komplex (Kopp and Ghosh, 1994), bzw. eine Blockierung des Proteosoms, was zu einer Stabilisierung von I- κ B (*inhibitor of kappa-B*) führt, nachgewiesen werden (Dikshit *et al*, 2006).

Die hier gezeigte Herunterregulation von c-FLIP im Speziellen durch Diclofenac steht in einem klaren Zusammenhang zur Sensitivierung der CTCL-Zellen für die TRAIL-induzierte Apoptose und bietet sich daher als eine mögliche Therapiestrategie an. Auch in

anderen Zellarten, wie Plattenepithelkarzinom-Zelllinien (SCC), konnte Diclofenac für Todesliganden-induzierte Apoptose sensitivieren (Fecker *et al*, 2010b). Auch konnte eine Hochregulation von TRAIL selbst für alle drei NSAIDs in HH-Zellen nachgewiesen werden, was zu einer zusätzlichen Aktivierung des extrinsischen Signalweges beitragen dürfte. Die Tatsache, dass weder NaS noch ASA eine vergleichbare Sensitivierung zeigten, spricht, im Vergleich zu Diclofenac, für einen anderen Wirkmechanismus dieser Substanzen.

Als einen wichtigen Schritt hin zu einer möglichen Anwendung von NSAIDs in der CTCL-Therapie konnte eine signifikante Apoptoseinduktion in *ex vivo*-behandelten Tumor-T-Zellen von CTCL-Patienten gezeigt werden. Das Ansprechen von CD4⁺ T-Zellen von gesunden Spendern weist indes auf Nebenwirkungen hin, die mit COX-unabhängigen Effekten der NSAIDs in Zusammenhang stehen dürften. Trotz dieser Nebenwirkungen sollte die anti-neoplastische Wirkung von NSAIDs in klinischen Studien weiter untersucht werden. Verschiedene NSAIDs werden bereits in der Behandlung von bestimmten Krebsentitäten eingesetzt, wie zum Beispiel Diclofenac bei aktinischer Keratose (Ulrich *et al*, 2010), bzw. werden in klinischen Studien untersucht, wie zum Beispiel Acetylsalicylsäure bei Brustkrebs (Agrawal and Fentiman, 2008) oder Celecoxib beim Kolonkarzinom (Half and Arber, 2009).

Zusammenfassend zeigen die hier vorgestellten Untersuchungen dass für CTCL-Zellen eine Resistenz gegenüber Todesliganden-induzierter Apoptose charakteristisch ist. Dysregulationen in den Apoptosesignalwegen umfassen dabei sowohl den Verlust von Apoptosemediatoren wie TNF-R1, Caspase-10 und Bid als auch eine starke und generelle Expression von anti-apoptotischen Faktoren wie c-FLIP. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen überdies, dass NSAIDs über effektive anti-tumorale Eigenschaften verfügen, die zur Aktivierung von Caspasen, zur Herabregulation von anti-apoptotischen Mediatoren wie c-FLIP und Mcl-1 sowie zur Hochregulation von TRAIL führen. Unter Berücksichtigung der jahrelangen Erfahrung mit den Nebenwirkungsprofilen aller drei untersuchten NSAIDs könnte man daher überlegen, diese Substanzen auch in der Therapie von CTCL einzusetzen. Auch andere Tumorentitäten, in denen c-FLIP als wichtiger Resistenzfaktor identifiziert wurde, könnten von den hier gezeigten Befunden profitieren.

4 Material & Methoden

4.1 Zellkultur – Zelllinien

Folgende kutane T-Zell-Lymphom-Zelllinien (CTCL) wurden eingesetzt: MyLa2059 wurde aus einer Plaque-Biopsie eines MF-Patienten generiert (Kaltoft *et al*, 1992); SeAx (Kaltoft *et al*, 1987) und HuT-78 (Gootenberg *et al*, 1981) stammen von PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) eines Patienten mit Sézary-Syndrom (SzS) ab; HH stammt von PBMCs eines Patienten mit aggressiver CTCL-Erkrankung ab (Starkebaum *et al*, 1991) (ATCC, CRL-2105, Manassas, VA, USA).

Folgende akute lymphatische T-Zell-Leukämie-Zelllinien (T-ALL) wurden als Kontrollen eingesetzt: CCRF-CEM (Foley *et al*, 1965), MOLT-4 (Minowada *et al*, 1972), Karpas-45 (Smith *et al*, 1973) and Jurkat (Schneider *et al*, 1977) (DSMZ, Braunschweig).

Folgende vier ALK-negative CD30-positive kutane anaplastische großzellige T-Zell-Lymphomzelllinien (cALCL) wurden eingesetzt: JK stammt von einem Patienten, dessen Lymphomatoide Papulose zu cALCL progredierte (Schiemann *et al*, 1999). Die Zelllinien Mac-1, Mac-2A sowie Mac-2B stammen von verschiedenen Proben eines Patienten, dessen Lymphomatoide Papulose zu cALCL progredierte. Mac-1 wurde während einer indolenten Phase der Erkrankung aus im Blut zirkulierenden Tumorzellen gewonnen. Mac-2A und Mac-2B stammen von zwei unterschiedlichen, schnell wachsenden Hauttumoren aus einer progredienten Phase der Erkrankung (Willers *et al*, 2003).

Als Kontrollen für die Expression von TRAIL-Decoy-Rezeptoren (DcR) wurden folgende Zelllinien eingesetzt: SW480, eine Kolonkarzinom-Zelllinie (Fogh *et al*, 1977) sowie HeLa, eine Cervix-Karzinom-Zelllinie (Scherer WF *et al*, 1953).

Für die Produktion von Lentiviren wurde eine modifizierte humane embryonale Nierenkarzinom-Zelllinie HEK 293T/17 (ATCC, CRL-11268) (Sena-Esteves *et al*, 1999) verwendet.

4.2 Zellkultur – Kultivierung

Alle Zelllinien wurden bei 37°C mit 5% CO₂ in einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre kultiviert. Folgende Medien kamen zum Einsatz: RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) mit 10% FKS, Penicillin/Streptomycin und L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Germany). Folgende Zelllinien wurden in RPMI 1640-Medium kultiviert: HH, HuT-78, MyLa2059, JK, Mac-1, Mac-2A, Mac-2B, Jurkat, MOLT-4, Karpas-45, CCRF-

CEM, SW480 und HeLa. Isolierte Tumor-T-Zellen aus Blut von SzS-Patienten sowie T-Zellen von gesunden Spendern wurden ebenfalls in RPMI 1640-Medium kultiviert.

Als weiteres Zellkulturmedium wurde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (32430, Gibco) mit 4,5 g/l Glucose, 25 mM Hepes, Glutamax, 10% FKS, Penicillin/Streptomycin verwendet. Folgende Zelllinien wurden damit kultiviert: SeAx und HEK 293T/17. Für SeAx wurde von Kaltoft *et al*, 1987 eine IL-2-Supplementierung für die Kultivierung beschrieben; auf diese wurde jedoch, für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Zelllinien, die ohne IL-2 kultiviert wurden, verzichtet.

4.3 Verwendete agonistische Antikörper

Die Todesliganden-vermittelte Apoptose wurde mit folgenden Todesliganden bzw. Rezeptoragonisten induziert: KillerTRAIL (soluble, human, rekombinant, ALX-201-073, Alexis, Gruenberg, 20 ng/ml), TNF- α (T-0157, Sigma, Taufkirchen, Germany, 10 ng/ml) und dem agonistischen anti-CD95-Antikörper CH-11 (Beckman Coulter, Krefeld, 10-100 ng/ml).

Für die Aktivierung des CD30-Rezeptors wurde der agonistische anti-CD30-Antikörper Ki-1 (0,1-0,5 μ g/ml) (Stein *et al*, 2000) bzw. ein Isotypkontrollantikörper (FLOPC-21, Sigma) eingesetzt.

4.4 Verwendete Reagenzien

Folgende nicht-selektive NSAIDs wurden verwendet: Acetylsalicylsäure (ASA, 2004, Caelo, Hilden, 1-5 mM), Natriumsalicylat (NaS, S-2679, Sigma, 1-5 mM) und Diclofenac (DF, D-6899, Sigma 5-120 μ g/ml).

Als Pancaspasen/Panproteasen-Inhibitor wurde Q-VD-OPh (Quinoline-Valine-Aspartic-CH₂-O-Phenyl, OPH001, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (50 μ M für HH, 10 μ M für MyLa) eingesetzt.

Für die Blockierung der NF- κ B-Signalwege wurde der allosterischer IKK-Inhibitor BMS-345541 (N- (1,8-Dimethylimidazo [1,2-a] quinoxalin-4-yl) -1,2-ethanediamine hydrochloride, B-9935, Sigma) und der Proteasom-Inhibitor LLnL (N-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal, A-6185, Sigma) eingesetzt.

4.5 Sterilisation von Lösungen und Nährmedien

Alle Puffer und Lösungen wurden in doppelt destilliertem Wasser angesetzt und durch Autoklavierung oder Filtrierung (Sterilfilter 0,2 μm oder 0,45 μm , Millipore, Carrigtwohill, Irland) sterilisiert. Die pH-Werte wurden bei Raumtemperatur bestimmt. Prozentangaben sind als Gewicht pro Volumen angegeben.

4.6 Durchflußzytometrie

Das Prinzip der Durchflußzytometrie erlaubt es, in kurzer Zeit eine große Zahl einzelner Zellen in Suspension zu untersuchen. Dabei können zunächst ohne weitere Vorbehandlung die Größe sowie die Granularität des Zytoplasmas von Zellen ermittelt werden. Die Zellen werden mittels Überdruck durch eine Messkammer gedrückt und beim Eintreten in diese mit einer Trägerflüssigkeit stark beschleunigt, wodurch sich Zellaggregate auflösen. Die Zellen passieren so vereinzelt den Strahl eines Argon-Lasers der Wellenlänge 488 nm. Dabei ergibt sich aus der Vorwärtsstreuung (FSC) des Lasers die Größe der Zelle sowie aus dem im rechten Winkel gestreuten Laserlicht, der sogenannten Seitwärtsstreuung (SSC), die Granularität. Über drei weitere Messkanäle (FL1: $\lambda = 530 \text{ nm}$, FL2: $\lambda = 585 \text{ nm}$, FL3: $\lambda = 650 \text{ nm}$) kann gleichzeitig zu diesen beiden Parametern Licht verschiedener Wellenlängen detektiert werden, was beim Nachweis von fluoreszenz-markierten Antikörpern Anwendung findet (Abbildung 33).

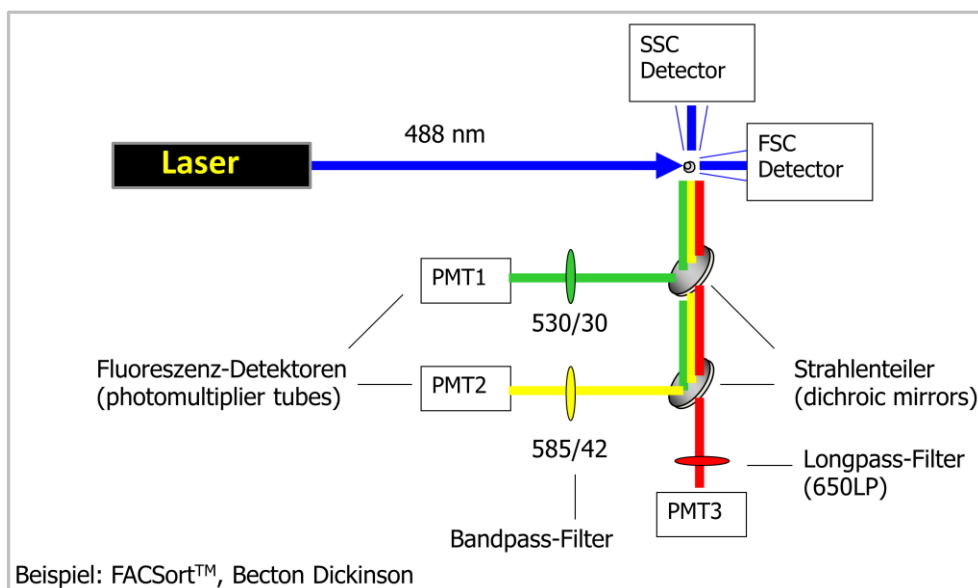


Abbildung 33

Optischer Aufbau eines FACSCalibur Durchflußzytometers (<http://www.bdbiosciences.com/instruments/facscalibur/features/index.jsp>).

So können mit diesem Verfahren Strukturen auf der Zelloberfläche oder nach Permeabilisierung der Zellen auch im Zellinneren nachgewiesen werden. Die hier vorgestellten durchflußzytometrischen Untersuchungen wurden mit dem FACSCalibur Durchflußzytometer (BD Bioscience) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der CellQuest Software (BD Bioscience) oder WinMDI version 2.9 (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

4.7 Oberflächenexpression – TRAIL

Der Nachweis der Oberflächenexpression von TRAIL erfolgte mittels Durchflußzytometrie. Hierfür wurden Zellen geerntet, mit eiskaltem PBS mit 1% BSA (A-2153, Sigma) gewaschen und mit anti-TRAIL-Antikörper (RIK-2, sc-56246 PE, Santa Cruz, 1:5) für 30 min im Dunkeln inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Isotypkontrollantikörper (IgG1 κ , 555749, BD Pharming, 1:5) verwendet. Nach anschließendem Waschen wurden die Proben umgehend mit einem FACSCalibur Durchflußzytometer gemessen (FL3, 10000 Zellen).

4.8 Oberflächenexpression – Rezeptoren

Die Oberflächenexpression der zu untersuchenden Rezeptoren erfolgte mittels Durchflußzytometrie. Von folgenden Rezeptoren wurde die Expression untersucht: TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5, TRAIL-R3/DcR1, TRAIL-R4/DcR2, CD95 und CD30.

Durchgeführtes Protokoll in Kürze: Für den Nachweis der Expression der TRAIL-Rezeptoren (TRAIL-R1-R4) wurden die Zellen mittels Zentrifugation 5 min 1200 rpm geerntet, das Zellpellet mit PBS gewaschen und 1×10^6 Zellen/ml in 100 μ l PBS mit 1% BSA resuspendiert und 30 min mit Antikörpern gerichtet gegen TRAIL-R1/DR4 (ALX-804-297, Alexis, HS101, 1:100), TRAIL-R2/DR5 (ALX-804-298, Alexis, HS201, 1:100), TRAIL-R3/DcR1 (mab6302, R&D-Systems, Minneapolis, USA, 1:100) oder TRAIL-R4/DcR2 (MAB633, clone 90906, R&D-Systems, 1:100) inkubiert. Als Kontrolle wurde parallel die Bindung eines Isotypkontrollantikörpers (clone MOPC-31C, 278-010, Ancell, Bayport, MN, USA, 1:100) bestimmt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einem Phycoerythrin-markierten (PE) Ziege anti-Maus IgG1-Antikörper (ALX-211-201-C050, Alexis, 1:100) für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Proben umgehend mit einem FACSCalibur Durchflußzytometer gemessen (FL3, 10000 Zellen).

Für die Bestimmung der Oberflächenexpression von CD95 wurden die Zellen mittels Zentrifugation 5 min 1200 rpm geerntet. Aliquots von 1×10^6 Zellen wurden in 100 μ l PBS mit 1% BSA resuspendiert und 30 min mit PE-markiertem monoklonalem anti-CD95-Antikörper (340480, clone DX2; Becton Dickinson; 1:6) oder Isotypkontrollantikörper (ALX-278-010, Alexis, clone MOPC-21, 1:6) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Proben mit einem FACSCalibur Durchflußzytometer gemessen (FL3, 10000 Zellen).

Die Expression von CD30 wurde mit Hilfe eines FITC-markierten anti-CD30-Antikörpers (FITC-conjugated mAb, Ber-H2; Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark, 1:50) bestimmt. Als Kontrolle wurden Zellen mit einem FITC-makierten Isotypkontrollantikörper (FITC-labeled mAb, IgG1; MOPC-21, Becton Dickinson, 1:6) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Proben mit einem FACSCalibur Durchflußzytometer gemessen (FL1, 10000 Zellen).

4.9 Nachweismethoden – Apoptose

Ein charakteristisches Merkmal der Apoptose stellt die Fragmentierung der Erbinformation (DNS) dar. Hierfür stehen verschiedene Nachweismethoden zur Verfügung: zum einen der direkte Nachweis von freien DNS-Enden mittels ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) bzw. die Quantifizierung der apoptotischen Sub-G1-Zellpopulationen mittels durchflußzytometrischer Analyse von Propidiumjodid (PI) gefärbten Zellkernen (Nicoletti-Assay).

4.9.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Nachweis der DNS-Fragmentierung erfolgte mittels *Cell Death Detection ELISA Kit* (11585045001, Roche Diagnostics, Mannheim). Hierbei werden Mono- und Oligonukleosomen nachgewiesen, diese bilden sich infolge der Fragmentierung der DNS in apoptotischen Zellen (Abbildung 34) (Eberle *et al*, 2003).

Durchgeführtes Protokoll in Kürze: Die zu untersuchenden Zellen wurden zunächst durch Zentrifugation 5 min bei 1200 rpm pelletiert. Der Überstand wurde für den Nekrose-Nachweis abgenommen und aufbewahrt. Das Zellpellet wurde in 1 ml Lysepuffer (mitgeliefert) resuspendiert und für 30 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Lysate erneut für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Für den Nachweis der DNS-Fragmentierung wurden 20 μ l der Lysate in eine mit Streptavidin beschichtete 96-Loch-Platte (mitgeliefert) pipettiert und mit 80 μ l Reagenzgemisch, bestehend aus

biotinyliertem anti-Histon-Antikörper (1:20) und Peroxidase-konjugiertem anti-DNS-Antikörper (1:20, verdünnt in Inkubationspuffer, mitgeliefert), für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Mikrotiterplatte 3-mal mit je 300 µl/Loch mit Inkubationspuffer gewaschen und so die ungebundenen Antikörper entfernt. Anschließend wurde in jedes Loch der Mikrotiterplatte 100 µl einer Peroxidase-Substratlösung, die ABTS (2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline Sulfonate)) enthält, gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die photometrische Bestimmung der gebundenen, Peroxidase-markierten Antikörper-DNA-Komplexe mittels eines ELISA-Reader (Dynatech, MR5000) bei einer Wellenlänge von 405 nm.

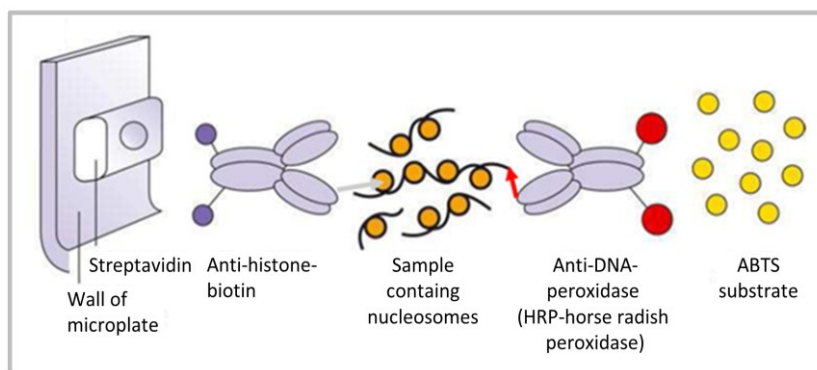


Abbildung 34

Cell Death Detection ELISA Kit – Prinzip. Der Test wird in einer Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte durchgeführt. Es bildet sich ein Komplex (Sandwich) aus anti-Histon-Biotin-Antikörper und anti-DNA-Peroxidase-Antikörper mit den Nucleosomen des Zelllysates. Die Detektion erfolgt über das ABTS-Substrat (Abbildung aus dem Datenblatt).

4.9.2 Propidiumjodid-Färbung

Die Quantifizierung des Anteils an apoptotischen, hypodiploiden Zellen (Sub-G1-Zellfraktion) in Prozent erfolgte mittels Durchflußzytometrie. Hierbei wird der DNS-Gehalt von Zellen mittels PI-Färbung nachgewiesen (Riccardi and Nicoletti, 2006).

Durchgeführtes Protokoll in Kürze: Dafür wurden die Zellen mittels Zentrifugation 5 min mit 2000 rpm geerntet, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in einer PI-Färbelösung, bestehend aus PI (40 µg/ml, sc-3541, Santa Cruz), Natriumcitrat (0,1%, S-4641, Sigma), Triton X-100 (0,1%, 37238, Serva), für mindestens 1 h inkubiert und der DNS-Gehalt der Kerne unter Verwendung des Fluoreszenzdetektors FL-3 durchflußzytometrisch bestimmt. Die Auswertung erfolgt mittels der CellQuest Software oder WinMDI Version 2.9.

4.10 Nachweismethode – Zytotoxizität

Der Nachweis der Zytotoxizität erfolgte mittels Nachweis der Laktatdehydrogenase (LDH) im Zellkulturüberstand mit dem *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)* (11644793, Roche Diagnostics) (Abbildung 35). Der Assay wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Durchgeführtes Protokoll in Kürze: Es wurden 20 µl zellfreien Überstandes abgenommen und mit den Reagenzien des Assays für 30 min im Dunkeln unter ständigem Schütteln inkubiert. Danach erfolgte die photometrische Bestimmung, mittels eines ELISA-Readers (Dynatech, MR5000).

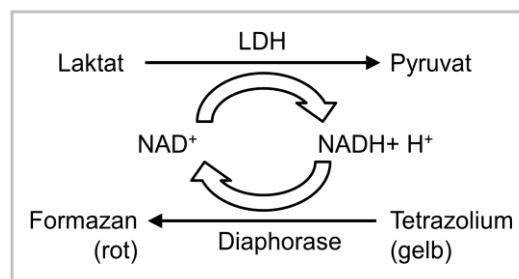


Abbildung 35

Cytotoxicity Detection Kit – Prinzip. Die Aktivität der Laktatdehydrogenase im Zellkulturüberstand katalysiert im ersten Schritt die Oxidation von Laktat zu Pyruvat, wodurch NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert wird. Nachfolgend wird H^+/H auf das Tetrazolium-Salz (gelb) übertragen, wodurch das photometrisch quantifizierbare Formazan-Salz (rot) entsteht (Abbildung aus dem Datenblatt).

4.11 Proteinanalytik (Westernblot-Analyse)

Durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können denaturierte Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dabei wandern die denaturierten und durch Natriumdodecylsulfat (SDS) negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld zur Anode. Durch einen Molekulargewichtsstandard (161-0374, Bio-Rad) kann die Größe der Proteine bestimmt werden. Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden auf eine Nitrozellulosemembran (Protran BA83, 0,2 µm, Whatman, Dassel) transferiert, auf der sie dann indirekt nachgewiesen werden können. Dies erfolgt durch die spezifische Bindung von primären Antikörpern, die ihrerseits durch sekundäre Meerrettich-Peroxidase-konjugierte Antikörper gebunden werden. Mit Hilfe der Meerrettich-Peroxidase, die das ECL-Reagenz (*enhanced chemilumineszenz*) umsetzen kann, kommt es zur Emittierung von Lumineszenzlicht, das den Nachweis von Antigenen auf Röntgenfilmen (Amersham Hyperfilm ECL, GE, Buckinghamshire, UK) ermöglicht.

4.11.1 Herstellung von Proteinextrakten mit Standard-Lysepuffer

Exponentiell wachsende Zellkultur mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml wurde für die Herstellung von Proteinextrakten verwendet. Grundsätzlich wurde ein Tag vor der Extraktion das Wachstumsmedium der Zellkultur gewechselt. Details des verwendeten Protokolls für die Herstellung von Gesamtproteinextrakten sowie die Durchführung der Westernblot-Analyse wurden in Eberle *et al*, 2003 beschrieben.

Durchgeführtes Protokoll in Kürze: Für die Herstellung von Gesamtproteinextrakten wurden Zellpellets in kaltem Standard-Lysepuffer resuspendiert und entweder mit einer 1 ml Kanüle aufgenommen (~10mal) oder 5 s mit einem Ultraschall-Homogenisator (Sonoplus, Typ MS-73, Bandelin, Berlin) behandelt, um so die freigesetzte DNS zu scheren. Anschließend wurden die Proteinextrakte für 10 min bei 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert und die Überstände in neue Eppendorfgefäße überführt. Die Lysate wurden bei -20°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels BCA-Methode (siehe 4.11.3)

4.11.2 Verwendete Puffer und Reagenzien – Standard-Proteinlysate

Standard-Lysepuffer 10 ml: Tris-HCl 100 µl (1M, pH 7,5, T-1503, Sigma); NaCl 480 µl (3 M, 1.06404, Merck); SDS 500µl (10%, L-4390, Sigma); Nonidet P-40 50 µl (N-3516, Sigma); Protease-Inhibitoren: Aprotinin 36 µl (10%, 10236624, Roche); Leupeptin 100 µl (11017101, Roche); Pepstatin A 100 µl (0,5 mg/ml, 253286, Roche); PMSF 100 µl (100 mM, P-7626, Sigma); EDTA 20 µl (0,5 M, pH 8,0, 8418, Merck); Aqua bidest. 8,5 ml oder PhosSTOP Phosphatase-Inhibitor Cocktail Tabletten (04906845, Roche).

4.11.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Methode

Die Konzentration von Proteinen kann durch eine Farbreaktion photometrisch bestimmt werden (BCA Protein Assay, 23225, Thermo Fischer Scientific). Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Biuret-Reaktion, bei der die Amino-Gruppen von Proteinen in alkalischem Medium Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren. Cu^+ reagiert dann mit Bicinchoninsäure (BCA) zu einem violetten Chelatkomplex, dessen Absorption in einem ELISA-Reader gemessen werden kann (Abbildung 36).

Durchgeführtes Protokoll in Kürze: Die zu bestimmenden Proteinextrakte sowie die Eichlösung wurden in Triplikaten in eine Mikrotiterplatte mit Flachboden vorgelegt. Für die Bestimmung wurden die Proteinextrakte (10 µl, 1:10 verd. in PBS) mit 200 µl Reaktionspuffer, bestehend aus Lösung A (4 µl) und Lösung B (196 µl), inkubiert. Als

Kalibrierlösung dient eine BSA-Lösung in verschiedenen Konzentrationen. Die Mikrotiterplatte wurde 30 min bei 37°C inkubiert und bei 550 nm im ELISA-Plate-Reader vermessen. Mit Hilfe der bekannten BSA-Konzentrationen konnte die Proteinmenge der Lysate bestimmt werden.

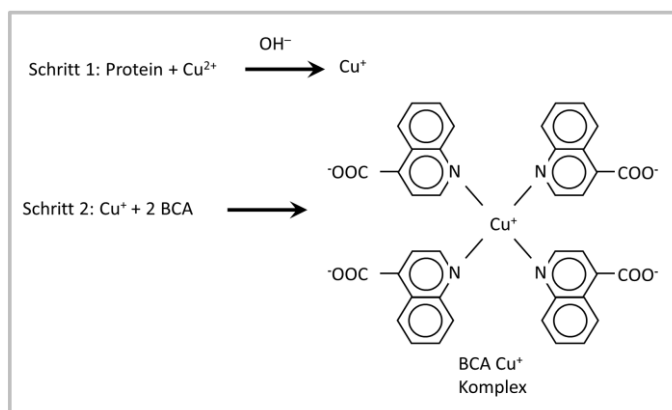


Abbildung 36

BCA-Nachweismethoden – Prinzip (verändert nach Thermo Fischer Scientific Datenblatt).

4.11.4 Herstellung von Proteinextrakten mit CHAPS-Lysepuffer

Für den Nachweis von Caspase-Spaltprodukten mittels Westernblot-Analyse wurden Proteinextrakte mit CHAPS-Lysepuffer hergestellt.

Durchgeführtes Protokoll in Kürze: Die Zellen wurden geerntet, mit kaltem PBS gewaschen und in CHAPS-Lysepuffer (9283, Cell Signaling) resuspendiert. Durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen der Proteinextrakte wurden die Plasmamembranen weiter aufgebrochen und die Proteinausbeute erhöht. Durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min wurde der Überstand von Zelltrümmern getrennt. Die Überstände wurden in neue Eppendorfgefäße überführt und bei -20°C aufbewahrt. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels Coomassie-Färbung bestimmt (siehe 4.11.5).

4.11.5 Konzentrationsbestimmung von CHAPS-Proteinextrakten

Die Proteinkonzentration von CHAPS-Extrakten wurde mit Hilfe einer Coomassie-Brilliantblau-Färbung bestimmt.

Durchgeführtes Protokoll in Kürze: Hierfür wurden je 10 µl einer Probe mit 3 µl Protein-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und in einem 12%igen Polyacrylamidgel mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung (Roti-BlueTM, A-152.1, Roth) über Nacht unter ständigem

Schütteln inkubiert. Zur Entfernung unspezifischer Färbung wurde das Gel in 25%iger Methanollösung 30 min gewaschen. Für die Auswertung wurden die gefärbten Banden digitalisiert und mit der TINA-Software quantifiziert. Für die Konzentrationsbestimmung wurde eine Kontrollprobe mit bekannter Konzentration eingesetzt.

4.11.6 Verwendete Puffer und Reagenzien – CHAPS-Proteinextrakte

CHAPS-Lysepuffer: 50 mM Pipes/HCl (pH 6,5), 2 mM EDTA, 0,1% CHAPS, 20 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin A, 10 µg/ml Aprotinin und 5 mM DTT (Dithiothreitol).

4.11.7 Elektrophorese – Protokoll

Das für die SDS-PAGE notwendige Sammelgel (5%) und Trenngel (12%) wurde mit Hilfe des Elektrophoresesystems (Mini Protean II, BioRad) vor der Elektrophorese hergestellt (King and Laemmli, 1971). Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol oder dest. Wasser überschichtet. Nach der Polymerisation wurde die Überschichtung (Isopropanol oder H₂O) abgegossen und mit Filterpapier nachgetrocknet. Das Sammelgel wurde darüber geschichtet und ein Gel-Kamm in das noch flüssige Sammelgel gesteckt. Die Proteinextrakte wurden mit Protein-Probenpuffer (1-fach) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Gel-Kämme wurden nach vollständiger Polymerisation entfernt, die Gele in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit Laufpuffer (1-fach) bedeckt. Die Taschen wurden mit Laufpuffer gespült, um diese von Luftblasen zu befreien. Anschließend wurden die Proben in die Taschen gefüllt und die Elektrophorese bei 80-160 V solange durchgeführt, bis die blaue Lauffront das Ende der Gele erreicht hatte.

4.11.8 Verwendete Puffer und Reagenzien – Elektrophorese

Sammelgel (5%ig) 5 ml: Acryl-/Bisacrylamid 0,84 ml (30%, 37,5:1, 161-0158, Bio-Rad); Sammelgelpuffer 2,5 ml; Aqua bidest. 1,6 ml; APS 100 µl (10%, 161-0700, Biorad); TEMED 10 µl (161-0800, Bio-Rad). Sammelgelpuffer (pH 6,8) 500 ml: Tris-Base 19,7 g (T1503, Sigma); SDS 1,0 g; Aqua bidest. ad 500 ml. Trenngel (12%ig) 10 ml: Acryl-/Bisacrylamid 4,0 ml (30%, 37,5:1); Trenngelpuffer 5,0 ml; Aqua bidest. 1,0 ml; APS 100 µl (10%); TEMED 10 µl. Trenngelpuffer (pH 8,8) 500 ml: Tris-Base 38,5 g; Tris-HCl 9,3 g; SDS 1,0 g; Aqua bidest. ad 500 ml. Protein-Probenpuffer (4x) 10ml: Tris-HCl 2,5 ml (1M, pH 6,8; T3253, Sigma); SDS 0,2 g (L-4390, Sigma); Glycerin 4 ml (1.04093, Merck); β-Mercaptoethanol 2 ml (M-7154, Sigma); Bromphenolblau 4 mg (Biorad); Aqua

bidest. 1,5 ml. Laufpuffer nach Laemmli (5x) 2 l: Tris-Base 30,4 g; Glycin 144 g (23390, Serva); SDS 10 g; Aqua bidest. ad 2 l.

4.11.9 Protein-Transfer-Protokoll

Der Blot, bestehend aus Nitrozellulosemembran und Trenngel, wurde in einer Wet-Blot-Kammer zusammengebaut, so dass das Gel zur Kathode hin ausgerichtet ist und die Nitrozellulosemembran zur Anode zeigt. An den Außenseiten wurden je zwei Filterpapiere und je ein Schwamm gelegt um eine gleichmäßige Befeuchtung zu gewährleisten. Die Blot-Komponenten wurden im Blotpuffer luftblasenfrei aufeinander geschichtet. Der Protein-Transfer wurde bei 100 mA für 90 min auf Eis durchgeführt. Zum Nachweis des Transfers wurden die Proteine auf der Membran mit PonceauS (P-7170, Sigma) angefärbt. Diese Färbung ist reversibel und konnte anschließend mit PBS-Tween wieder vollständig entfärbt werden. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4°C oder 1 h bei Raumtemperatur mit Blockierlösung (5%) inkubiert und so die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran blockiert.

4.11.10 Verwendete Puffer und Reagenzien – Protein-Transfer

Transferpuffer (1x) 2 l: Tris-Base 11,64 g; Glycin 4,36 g; SDS 3,7 g; Methanol 400 ml; Aqua bidest. ad 2 l. Phosphat-buffered Saline (PBS)-Tween (0,05%): PBS Dulbecco 9,55 g (L182-50, Biochrom); Tween20 0,5 ml (P-9416, Sigma); Aqua bidest. ad 1 l. Blockierlösung (5%): Fettfreie Trockenmilch (*blotting grade*) 5 g (170-6404, Bio-Rad); Phosphate-buffered Saline 0,05% Tween ad 100 ml.

4.11.11 Enhanced Chemilumineszenz (ECL)

Die ECL-Lösung für eine Membran, bestehend aus 2 ml Lösung A, 200 µl Lösung B und 0,6 µl H₂O₂ (H-1009, Sigma), wurde kurz vor Gebrauch gemischt und auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Nach 1 min Inkubation unter Schwenken wurde die Membran zwischen zwei Folien luftblasenfrei in eine Filmkassette gelegt und die Röntgenfilme in einer Dunkelkammer für 1 Sekunde bis zu 2 Stunden belichtet. Zur Auswertung wurden die Proteinbanden auf dem Röntgenfilm anhand des Proteinmarkers bzw. entsprechenden Positivkontrollen identifiziert.

4.11.12 Verwendete Puffer und Reagenzien – ECL

Lösung A: Natriumsalz von Luminol (50 mg, A-4685, Sigma) gelöst in 200 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8,6; Lösung B: p-Hydroxycoumarinsäure (11 mg, C-9008, Sigma) gelöst in 10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO, 20385, Serva).

4.11.13 Verwendete Antikörper: Westernblot-Analyse

Verwendete primäre Antikörper: β -Actin (A5541, Sigma-Aldrich, Seelze, 1:5000), Bak (Y164, Epitomics Inc., Burlingame, CA, USA, 1:200), Bax (N-20, sc-493, Santa Cruz, 1:200), Bcl-2 (sc-509, Santa Cruz, 1:200), Bcl-x_L (S-18, sc-634, Santa Cruz, 1:200), Bid (2002, Cell Signaling, 1:1000), Bok (4521, Cell Signaling, 1:1000), Caspase-8 (9746, 1C12, Cell Signaling, 1:1000), Caspase-10 (4C1, MBL Inter., Watertown, MA, USA, 1:1000), Caspase-9 (9502, Cell Signaling, 1:1000), Caspase-3 cleavage products (9661, Asp175, Cell Signaling, 1:1000), Procaspase-3 (9662, Cell Signaling, 1:1000), Cytochrome C (BD Biosciences, San Diego, CA, USA, 1:1,000), FADD (2782, Cell Signaling, Danvers, 1:1000), c-FLIP_{L/S} (G-11, sc-5276, Santa Cruz, 1:200), GAPDH (6C5, sc-32233, Santa Cruz, 1:1000), cIAP-1 (sc-7943, Santa Cruz, 1:200), cIAP-2 (sc-7944, Santa Cruz, 1:200), I κ B α (C-21, sc-371, Santa Cruz, 1:200), Mcl-1 (sc-12756, Santa Cruz, 1:200), Noxa (2437, ProSci Inc., Poway, CA, USA, 1:200), Puma (1652-1, Epitomics, 1:200), p52 (C-5, sc-7386, Santa Cruz, 1:200), Survivin (D-8, sc-17779, Santa Cruz, 1:200), TNF-R1 (H5, sc-8436, Santa Cruz, Heidelberg, 1:200), TRAIL-R1/DR4 (ab8414, Acris Antibodies, Hiddenhausen, 1:500), TRAIL-R2/DR5 (ab8416, Acris Antibodies, 1:500), α -Tubulin (2144, Cell Signaling, 1:1000), XIAP (2042, Cell Signaling, 1:1000) und anti-Porin 31 HL (VDAC, 529536, Calbiochem, 1:5000).

Verwendete sekundäre Antikörper: Meerrettich-Peroxidase (Hrp)-markierte Ziege anti-Maus IgG-, Ziege anti-Kaninchen IgG- und Kaninchen anti-Ziege IgG-Antikörper (Dako Cytomation, Hamburg, 1:5000).

4.12 Herstellung von Zellfraktionierungslysaten

Zur Bestimmung der Cytochrom C-Freisetzung sowie der mitochondrialen Translokation von Bax wurden die Mitochondrien und das Zytosol von zu untersuchenden Zellen mit Hilfe eines Mitochondrien-Fraktionierungs-Kits (ALX-850-276, Alexis, Gruenberg) isoliert.

Durchgeführtes Protokoll in Kürze: Hierfür wurden 1×10^7 Zellen geerntet, mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und bei 800 g bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml

Zytosol-Extraktionspuffer (mitgeliefert) resuspendiert und 10 min auf Eis äquilibriert. Die Zellen wurden anschließend in einem 1 ml Glas-Homogenisator mit 40-60 Stößen auf Eis homogenisiert bis circa 75% der Zellen aufgebrochen waren. Das Homogenisat wurde mit 800 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Zur Isolierung der Mitochondrien wurde der Überstand dann mit 10000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand enthielt die zytosolische Fraktion (Cyto) und wurde bei -20°C gelagert. Das Pellet, die mitochondriale Fraktion (Mito), wurde in 100 µl Mitochondrien-Extraktionspuffer resuspendiert und ebenfalls bei -20°C gelagert.

4.13 Nachweismethode – mitochondriales Membranpotential ($\Delta\Psi_m$)

Nachweis des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) erfolgte mittels des nicht toxischen, kationischen Farbstoffes Tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate (TMRM⁺, T5428, Sigma). Der Nachweis basiert auf der Akkumulation des Farbstoffes, auf Grund seiner positiven Ladung, in den negativ geladenen Mitochondrien. Daher zeigt eine verminderte TMRM⁺-Fluoreszenz eine Störung in der Ladungstrennung von Mitochondrien an.

Durchgeführtes Protokoll in Kürze: Die Zellen wurden geerntet, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 200 µl TMRM⁺-Lösung (1 µM) resuspendiert und für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, in 200 µl PBS resuspendiert und umgehend im Durchflußzytometer gemessen (FL2, 10000 Zellen). Die Auswertung erfolgte mittels CellQuest Software oder WinMDI version 2.9.

4.14 Nachweismethode – ROS (*reactive oxygen species*)

Der Nachweis von intrazellulärem ROS-Level erfolgte durch den Farbstoff H₂DCFDA (2-7-dichlorodihydrofluoresceindiacetate, Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, Oregon, USA).

Durchgeführtes Protokoll in Kürze: Die Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und mit H₂DCFDA (50 µM) für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen, in 200 µl PBS resuspendiert und umgehend im Durchflußzytometer vermessen (FL3, 10000 Zellen). Die Auswertung erfolgte mittels CellQuest Software oder WinMDI version 2.9.

4.15 Nachweismethode – Zellvitalität

Nachweis der Zellviabilität erfolgte mittels WST-1 *Cell Proliferation Assay* (11644807, Roche Diagnostics, Mannheim), welcher die Aktivität von mitochondrialen Enzymen nachweist.

Durchgeführtes Protokoll in Kürze: In 96-Loch-Platten wurden $1,5 \times 10^4$ Zellen in 100 μ l Medium ausgesät und mit 10 μ l WST-1 Reagenz pro Loch inkubiert. Die Umsetzung des Reagenzes wurde per ELISA-Reader bei der Wellenlänge 450nm/690nm bestimmt. Die Zellvitalität wurde in Prozent, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (C = 100%), angegeben.

4.16 NF- κ B-Bindungsnachweis

Die Kerntranslokation von NF- κ B-Untereinheiten (p65 und p50) wurde mittels eines NF- κ B-Bindungs-ELISA (43296, TransAM NF- κ B family ELISA Kit, Active Motif, Rixensart, Belgien) untersucht.

Durchgeführtes Protokoll in Kürze: In 6-Loch-Platten wurden 2×10^5 Zellen pro Loch ausplattiert und mit dem agonistischen anti-CD30-Antikörper Ki-1 (0,5 μ g/ml) für 16 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und Kernproteinextrakte mit Hilfe eines *Nuclear Extraction Kit* (40010, Active Motif), entsprechend den Angaben des Herstellers, hergestellt. Die Proteinkonzentration wurde mittels der BCA-Methode ermittelt (siehe 4.11.3). Für den NF- κ B-Assay wurden dann 8 μ g Protein in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte, die mit NF- κ B-Konsensussequenzen beschichtet sind, gegeben. An diese Sequenzen binden die in den Kernextrakten enthaltenen NF- κ B-Untereinheiten und werden so immobilisiert. Im nächsten Schritt wurden die gebundenen Untereinheiten mittels spezifischer Antikörper markiert und diese dann durch Meerrettich-Peroxidase gebundene sekundäre Antikörper detektiert. Die Farbreaktion bei Anwesenheit von gebundenen NF- κ B-Untereinheit kann bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einem ELISA-Reader bestimmt werden.

4.17 Herstellung von anti-cFLIP shRNA-Lentiviren

Lentiviren besitzen die Eigenschaft, ihr virales RNA-Genom revers zu transkribieren und während des Replikationszyklus ihre Erbinformation stabil in das Genom der infizierten eukaryotischen Wirtszelle zu integrieren. Dies ermöglicht den stabilen Gentransfer auch von Zellen, die mit anderen Methoden nur unzureichend Fremdgene aufnehmen, wie zum Beispiel T-Zellen. Für die Herstellung von cFLIP^{RNAi}- und Scramble^{RNAi}-Vektoren,

wurden entsprechende Oligonukleotidsequenzen synthetisiert (MWG, Ebersberg), annealed und über eine HpaI/XhoI Restriktionsstelle in einen U6-Promotor gesteuerten Vektor (pLL3.7, Addgene, Cambridge, MA, USA) (Rubinson *et al*, 2003) kloniert.

Die verwendeten Sequenzen waren c-FLIP shRNA-Sequenz: (5'-GAA TAG ACC TGA AGA CAA ATT CAA GAG ATT TGT CTT CAG GTC TAT TCT TTT TT-3') und Scramble shRNA-Sequenz: (5'-CAG GAG CTA TGC TAC CAT TTC AAG AGA ATG GTA GCA TAG CTC CTG CTT TTT T-3'). Als zusätzliche Kontrolle wurden unbehandelte Zellen sowie Mock (Vektor ohne Insert)-transduzierte Zellen eingesetzt (Braun *et al*, 2010).

Die Produktion der VSV-G-pseudotypisierten, replikationsdefizienten Lentiviren sowie die Transduktion der Zielzellen wurden durchgeführt wie bei (Al Yacoub *et al*, 2007) im Detail beschrieben. Die Transduktionseffizienz wurde anhand der GFP-Expression (*green fluorescent protein*) bestimmt.

Durchgeführtes Protokoll in Kürze: Für die Virusproduktion wurden HEK 293/T17 Zellen 6×10^6 Zellen/ml in einer Petrischale (10 cm²) ausgesät und mittels Calciumphosphat-Kopräzipitation mit Transfervektor (pLL3.7, 18 µg Plasmid), Verpackungsvektor (psPAX2, 9 µg Plasmid, Addgene) sowie Envelopevektor (pMD2.G, 9 µg Plasmid, Addgene) kotransfiziert. Nach 6 h erfolgte ein Mediumwechsel; anschließend wurden die Zellen für weitere 48 h kultiviert. Der virushaltige Überstand wurde abgenommen für 5 min bei 800 g zentrifugiert und über einen 0,45 µm-Filter von Zelltrümmern befreit. Aliquots dieses Überstandes wurden bei -80°C gelagert. Der Virustiter des Überstandes wurde anhand der GFP-Expression von infizierten HeLa-Zellen bestimmt.

Für die Infektion von Suspensionszellen wurden 3×10^5 Zellen/ml mit virushaltigem Medium mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 10 und Polyberene (8 µg/ml, H9268, Sigma) zunächst für 1 h bei 800 g zentrifugiert, danach für 3 h im Brutschrank inkubiert und anschließend mit frischem, virushaltigem Medium erneut für 1 h zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 6-Lochplatten für 16 h kultiviert, gefolgt von weiteren 24 h mit frischem, virusfreiem Medium.

Der Knockdown von c-FLIP wurde in Gesamtproteinextrakten von cFLIP^{RNAi}- und Scramble^{RNAi}-transduzierten Zellen mittels Westernblot-Analyse überprüft (siehe 4.11). Der RNAi-medierte *Knockdown* von c-FLIP-mRNA wurde mittels Reverse-Transkriptase PCR überprüft.

Durchgeführtes Protokoll in Kürze: Total RNA-Extrakte von cFLIP^{RNAi}- und Scramble^{RNAi}-transduzierten Zellen wurde mittels RNeasy Mini Kit (74106, Qiagen,

Hilden) hergestellt und cDNS mittels Ready-To-Go™ You-Prime First-Strand Beads (27-9264-01, GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Schweden) synthetisiert. Für die PCR-Reaktion wurden folgende Sequenzen als Primer verwendet: c-FLIP: 5'-TGT TGA TGC TTT TGA CTT TC-3' (forward) und 5'-ACA GCT TTT CTG TCC ATC TT-3' (reverse); GAPDH: 5'- GTC AGT GGT GGA CCT GAC CT -3' (forward) and 5'-AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG-3' (reverse). Die Amplifikation erfolgte bei 55°C Annealing-Temperatur und dauerte 24 Zyklen.

4.17.1 Verwendete Puffer und Reagenzien – Virusproduktion

Calciumphosphat-Präzipitationspuffer: CaCl₂ 60 µl (2,5 M, C1016, Sigma), HBS (2x)-Puffer pH 7,03, 600 µl (NaCl 0,26 M, KCl 10 mM, Na₂HPO₄ 1,4 mM, D-Glucose 10 mM) und HEPES 600 µl (42 mM; 4-2-Hydroxyethylpiperazine-1-ethanesulfonic acid, H3034, Sigma).

4.18 Herstellung von c-FLIP_L-überexprimierenden Zellen

Die Überexpression von c-FLIP_L erfolgte mit Hilfe eines lentiviralen Vektors, der von Prof. M. Leverkus (Universitätsmedizin Mannheim UMM) zur Verfügung gestellt wurde. Die Generierung der Viruspartikel sowie das Transduktionsprotokoll sind im Detail in (Geserick *et al*, 2008) beschrieben. Die stabile Integration wurde mittels Selektion auf Zeocin-Resistenz (ant-zn-1, InvivoGen, SanDiego, CA, USA, 100-500 µg/ml) sichergestellt. Zusätzlich wurde die Transduktionseffizienz durchflußzytometrisch anhand der GFP-Expression überwacht.

4.19 Leukapherese isolierte PBMC von Sézary-Syndrom-Patienten

Periphere weiße Blutzellen (PBMCs) von Patienten sowie von gesunden Spendern wurden mittels Leukapherese isoliert. Anschließend wurden die Zellen zunächst mit PBS mit 0,1% BSA und Heparin, zur Unterdrückung der Gerinnung, sowie ein zweites Mal ohne Heparin gewaschen. Die Pelletierung erfolgte durch Zentrifugation bei 300 g für 5 min. Die Zellen wurde bei -140°C in 90% FKS mit 10% DMSO eingefroren und gelagert. Für die Rekultivierung der Zellen wurden diese schnell aufgetaut, zweimal in PBS gewaschen und anschließend in entsprechendem Zellkulturmedium aufgenommen. Der Anteil an Tumor-T-Zellen wurde auf 60-80% geschätzt. Die untersuchten PBMC-Proteinextrakte stammen von Patienten mit Sézary-Syndrom im Stadium IVB (2 Männlich, 2 Weiblich; Durchschnittsalter 77 Jahre). Tumorlast der Patienten lag zwischen $7,3 \times 10^6$ Zellen/ml und

$1,9 \times 10^6$ Zellen/ml. Alle Patienten wurden bereits mit PUVA-Therapie und IFN- α sowie weiteren Therapien behandelt (Methotrexat, Chlorambucil/Prednisolon, extrakorporale Photochemotherapie oder Leukapherese) (siehe Abbildung 20).

4.20 Immunhistologie von CTCL-Patientenbiopsien

Für die immunhistologischen Untersuchungen wurden paraffinierte Schnitte von Biopsien von CTCL-Patienten der Klinik für Dermatologie der Charité zur Verfügung gestellt. Es wurden Schnitte von Patienten mit Mycosis fungoides (MF) und CD30-positivem cALCL untersucht.

Die Tumor-T-Zellen in den histologischen MF-Schnitten wurden entsprechend ihrer CD3-Expression und Kernmorphologie (Wirbel) identifiziert. Die 35 Patientenbiopsien (histologische Schnitte), die immunhistologisch auf c-FLIP-Expression untersucht wurden, sind sowohl klinisch als auch histologisch als Mycosis fungoides diagnostiziert (19x Stadium IB, 11x Stadium IIB, 5x Stadium II, Anteil Frauen 25%, Durchschnittsalter 64 Jahre) worden. Die Identifizierung der kutanen ALCL Tumor-T-Zellen erfolgte sowohl durch den Nachweis von CD30-Expression als auch durch morphologische Kriterien.

Durchgeführtes Protokoll in Kürze: Die Antigen-Epitope wurden mittels Kochen unter Dampfdruck für 2 min in Zitratpuffer (20 mM EDTA Puffer, pH 8,0) (Abbildung 20), bzw. in Zitratpuffer (1 mM EDTA, pH 6,0) (Abbildung 25), erreichbar gemacht. Die immunhistologische Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Färbung wurde entsprechend dem Standard Protokoll (Cordell *et al*, 1984) durchgeführt. Für den Nachweis von c-FLIP, Bid und CD30 wurden folgende Antikörper verwendet: CD30 (Ber-H2, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Institut für Pathologie, Berlin, 1:50), c-FLIP (G-11, sc-5276, Santa Cruz, 1:25) und Bid (IHC-00121, Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA, 1:100).

4.21 Isolierung von Tumor-T-Zellen von Sézary-Syndrom-Patienten

Tumor-T-Zellen von Sézary-Syndrom-Patienten und CD4-positive T-Zellen von gesunden Spendern wurden mittels Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Schweden) Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. Die Tumor-T-Zell-Populationen wurden anhand der tumor-spezifischen TCR β -Umlagerung identifiziert und mittels fluorchrom-konjugiertem anti-V β -spezifischem Antikörper (Beckman Coulter, Krefeld) sowie anti-Fluorchrom MicroBeads (130-048-801, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) isoliert. Als Kontrollzellen wurden CD4-exprimierende Zellen isoliert (130-045-101, Miltenyi Biotec).

Sowohl die Anreicherung als auch die Reinheit der isolierten Zellen wurde mittels Durchflußzytometrie überwacht. Die verwendeten Antikörper CD3, CD4 und CD8 wurden von BD Bioscience (Heidelberg, Germany) erworben.

Die CTCL-Patienten (1 Männlich, 3 Weiblich; Durchschnittsalter 63 Jahre) wurden mit Sézary-Syndrom diagnostiziert. Alle vier Patienten wurden mit Psoralen-UVA und/oder IFN- α behandelt bzw. hatten darüber hinaus zusätzliche Therapien (Methotrexat, Chlorambucil/Prednisolon, extrakorporale Photochemotherapie oder Leukapherese) (siehe Abbildung 32). Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt und entsprechend den Richtlinien der Helsinki-Erklärung durchgeführt.

4.22 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Signifikanz wurde mit Hilfe der Student'schen t -Verteilung bestimmt. Als statistisch signifikant wurden Werte mit einem p -Wert $< 0,05$ [*] bewertet und als hoch signifikant, wenn der p -Wert $< 0,01$ [**] war.

Literaturverzeichnis

- Agrawal, A. und Fentiman, I. S. (2008): NSAIDs and breast cancer: a possible prevention and treatment strategy. *Int J Clin Pract* 62 [3], 444-449. URL: PM:18194278
- Al Yacoub, N., Romanowska, M., Haritonova, N., Foerster, J. (2007): Optimized production and concentration of lentiviral vectors containing large inserts. *J Gene Med* 9 [7], 579-584. URL: PM:17533614
- Altieri, D. C. (2010): Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem J* 430 [2], 199-205. URL: PM:20704571
- Ashkenazi, A. (2002): Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2 [6], 420-430.
- Assaf, C., Bagot, M., Dummer, R., Duvic, M., Gniadecki, R., Knobler, R. *et al.* (2006): Minimizing adverse side-effects of oral bexarotene in cutaneous T-cell lymphoma: an expert opinion. *Br J Dermatol* 155 [2], 261-266. URL: PM:16882161
- Bagnoli, M., Canevari, S., Mezzanzanica, D. (2010): Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 42 [2], 210-213. URL: PM:19932761
- Bao, Q. und Shi, Y. (2007): Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* 14 [1], 56-65. URL: PM:16977332
- Barnhart, B. C., Alappat, E. C., Peter, M. E. (2003): The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* 15 [3], 185-193. URL: PM:14563117
- Bassan, R., Gatta, G., Tondini, C., Willemze, R. (2004): Adult acute lymphoblastic leukaemia. *Critical Reviews in Oncology Hematology* 50 [3], 223-261. URL: ISI:000222133200004
- Baud, V. und Karin, M. (2009): Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov* 8 [1], 33-40. URL: PM:19116625
- Bellosillo, B., Pique, M., Barragan, M., Castano, E., Villamor, N., Colomer, D. *et al.* (1998): Aspirin and salicylate induce apoptosis and activation of caspases in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 92 [4], 1406-1414. URL: PM:9694730
- Beyer M, Möbs M, Humme D, Sterry W (2011): Pathogenesis of Mycosis fungoides. *J Dtsch Dermatol Ges* 9 [8], 594-599. URL: PM:21790979
- Birnbaum, M. J., Clem, R. J., Miller, L. K. (1994): An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol* 68 [4], 2521-2528. URL: PM:8139034
- Blankenship, J. W., Varfolomeev, E., Goncharov, T., Fedorova, A. V., Kirkpatrick, D. S., Izrael-Tomasevic, A. *et al.* (2009): Ubiquitin binding modulates IAP antagonist-

- stimulated proteasomal degradation of c-IAP1 and c-IAP2(1). *Biochem J* 417 [1], 149-160. URL: PM:18939944
- Boll, B., Hansen, H., Heuck, F., Reiners, K., Borchmann, P., Rothe, A. *et al.* (2005): The fully human anti-CD30 antibody 5F11 activates NF-kappa B and sensitizes lymphoma cells to bortezomib-induced apoptosis. *Blood* 106 [5], 1839-1842. URL: ISI:000231495000053
- Bollrath, J. und Greten, F. R. (2009): IKK/NF-kappaB and STAT3 pathways: central signalling hubs in inflammation-mediated tumour promotion and metastasis. *EMBO Rep* 10 [12], 1314-1319. URL: PM:19893576
- Borowitz, M. J., Weidner, A., Olsen, E. A., Picker, L. J. (1993): Abnormalities of circulating T-cell subpopulations in patients with cutaneous T-cell lymphoma: cutaneous lymphocyte-associated antigen expression on T cells correlates with extent of disease. *Leukemia* 7 [6], 859-863. URL: PM:7684799
- Braschoss, S., Hirsch, B., Dubel, S., Stein, H., Durkop, H. (2007): New anti-CD30 human pancreatic ribonuclease-based immunotoxin reveals strong and specific cytotoxicity in vivo. *Leuk Lymphoma* 48 [6], 1179-1186. URL: PM:17577782
- Bratton, S. B. und Salvesen, G. S. (2010): Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci* 123 [Pt 19], 3209-3214. URL: PM:20844150
- Braun, F. K., Fecker, L. F., Schwarz, C., Walden, P., Assaf, C., Durkop, H. *et al.* (2007): Blockade of death receptor-mediated pathways early in the signaling cascade coincides with distinct apoptosis resistance in cutaneous T-cell lymphoma cells. *J Invest Dermatol* 127 [10], 2425-2437. URL: PM:17495957
- Braun, F. K., Hirsch, B., Al Yacoub, N., Durkop, H., Assaf, C., Kadin, M. E. *et al.* (2010): Resistance of cutaneous anaplastic large-cell lymphoma cells to apoptosis by death ligands is enhanced by CD30-mediated overexpression of c-FLIP. *J Invest Dermatol* 130 [3], 826-840. URL: PM:19890350
- Brenner, D., Krammer, P. H., Arnold, R. (2008): Concepts of activated T cell death. *Crit Rev Oncol Hematol* 66 [1], 52-64. URL: PM:18289867
- Bresalier, R. S., Sandler, R. S., Quan, H., Bolognese, J. A., Oxenius, B., Horgan, K. *et al.* (2005): Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med* 352 [11], 1092-1102. URL: PM:15713943
- Bretscher, P. (2004): Living with the ups and downs of the two signal model. *Immunol Cell Biol* 82 [2], 141-148. URL: PM:15061766
- Broker, L. E., Kruyt, F. A., Giaccone, G. (2005): Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 11 [9], 3155-3162.
- Budd, R. C., Yeh, W. C., Tschopp, J. (2006): cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nat Rev Immunol* 6 [3], 196-204. URL: PM:16498450
- Burg, G., Kempf, W., Cozzio, A., Dobbeling, U., Feit, J., Golling, P. *et al.* (2006): Cutaneous malignant lymphomas: update 2006. *J Dtsch Dermatol Ges* 4 [11], 914-933. URL: PM:17081267

- Burg, G., Kempf, W., Cozzio, A., Feit, J., Willemze, R., Jaffe, E. S. *et al.* (2005): WHO/EORTC classification of cutaneous lymphomas 2005: histological and molecular aspects. *Journal of Cutaneous Pathology* 32 [10], 647-674. URL: ISI:000233314600001
- Butcher, E. C. und Picker, L. J. (1996): Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272 [5258], 60-66. URL: PM:8600538
- Butler, L. M., Liapis, V., Bouralexis, S., Welldon, K., Hay, S., Thai, I. M. *et al.* (2006): The histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, overcomes resistance of human breast cancer cells to Apo2L/TRAIL. *Int J Cancer* 119 [4], 944-954.
- Cha, Y. I. und DuBois, R. N. (2007): NSAIDs and cancer prevention: targets downstream of COX-2. *Annu Rev Med* 58, 239-252. URL: PM:17100552
- Chan, K., Truong, D., Shangari, N., O'Brien, P. J. (2005): Drug-induced mitochondrial toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 1 [4], 655-669. URL: PM:16863431
- Chaplin, D. D. (2010): Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 125 [2 Suppl 2], S3-23. URL: PM:20176265
- Chiarle, R., Podda, A., Prolla, G., Gong, J., Thorbecke, G. J., Inghirami, G. (1999): CD30 in normal and neoplastic cells. *Clin Immunol* 90 [2], 157-164. URL: PM:10080826
- Chipuk, J. E. und Green, D. R. (2008): How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in Cell Biology* 18 [4], 157-164. URL: ISI:000255452300002
- Chipuk, J. E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. J., Green, D. R. (2010): The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 37 [3], 299-310. URL: PM:20159550
- Chun, H. J., Zheng, L., Ahmad, M., Wang, J., Speirs, C. K., Siegel, R. M. *et al.* (2002): Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature* 419 [6905], 395-399. URL: PM:12353035
- Clevers, H. (2006): Colon cancer--understanding how NSAIDs work. *N Engl J Med* 354 [7], 761-763. URL: PM:16481647
- Cohen, G. M. (1997): Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1), 1-16. URL: PM:9337844
- Cole, B. F., Logan, R. F., Halabi, S., Benamouzig, R., Sandler, R. S., Grainge, M. J. *et al.* (2009): Aspirin for the chemoprevention of colorectal adenomas: meta-analysis of the randomized trials. *J Natl Cancer Inst* 101 [4], 256-266. URL: PM:19211452
- Contassot, E., Kerl, K., Roques, S., Shane, R., Gaide, O., Dupuis, M. *et al.* (2008): Resistance to FasL and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in Sezary syndrome T-cells associated with impaired death receptor and FLICE-inhibitory protein expression. *Blood* 111 [9], 4780-4787. URL: ISI:000255387400049

- Cordell, J. L., Falini, B., Erber, W. N., Ghosh, A. K., Abdulaziz, Z., MacDonald, S. *et al.* (1984): Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Histochem Cytochem* 32 [2], 219-229. URL: PM:6198355
- Cuzick, J., Otto, F., Baron, J. A., Brown, P. H., Burn, J., Greenwald, P. *et al.* (2009): Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an international consensus statement. *Lancet Oncol* 10 [5], 501-507. URL: PM:19410194
- Daniel, P. T., Schulze-Osthoff, K., Belka, C., Guner, D. (2003): Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins. *Essays Biochem* 39, 73-88. URL: PM:14585075
- Daniels, M. A. und Teixeira, E. (2010): The persistence of T cell memory. *Cell Mol Life Sci* 67 [17], 2863-2878. URL: PM:20364394
- Day, T. W., Najafi, F., Wu, C. H., Safa, A. R. (2006): Cellular FLICE-like inhibitory protein (c-FLIP): a novel target for Taxol-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol* 71 [11], 1551-1561. URL: PM:16579975
- Degterev, A. und Yuan, J. (2008): Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 [5], 378-390. URL: PM:18414491
- Demaria, S., Pikarsky, E., Karin, M., Coussens, L. M., Chen, Y. C., El Omar, E. M. *et al.* (2010): Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. *J Immunother* 33 [4], 335-351. URL: PM:20386472
- Demierre, M. F., Gan, S., Jones, J., Miller, D. R. (2006): Significant impact of cutaneous T-cell lymphoma on patients' quality of life: results of a 2005 National Cutaneous Lymphoma Foundation Survey. *Cancer* 107 [10], 2504-2511. URL: PM:17048251
- Dereure, O., Levi, E., Vonderheid, E. C., Kadin, M. E. (2002): Infrequent Fas mutations but no Bax or p53 mutations in early mycosis fungoides: a possible mechanism for the accumulation of malignant T lymphocytes in the skin. *J Invest Dermatol* 118 [6], 949-956. URL: PM:12060388
- Di Pietro, R. und Zauli, G. (2004): Emerging non-apoptotic functions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L. *Journal of Cellular Physiology* 201 [3], 331-340. URL: ISI:000224874300001
- Dihlmann, S., Klein, S., Doeberitz Mv, M. K. (2003): Reduction of beta-catenin/T-cell transcription factor signaling by aspirin and indomethacin is caused by an increased stabilization of phosphorylated beta-catenin. *Mol Cancer Ther* 2 [6], 509-516. URL: PM:12813129
- Dikshit, P., Chatterjee, M., Goswami, A., Mishra, A., Jana, N. R. (2006): Aspirin induces apoptosis through the inhibition of proteasome function. *J Biol Chem* 281 [39], 29228-29235. URL: PM:16880202
- Din, F. V., Dunlop, M. G., Stark, L. A. (2004): Evidence for colorectal cancer cell specificity of aspirin effects on NF kappa B signalling and apoptosis. *Br J Cancer* 91 [2], 381-388. URL: PM:15188000

- Djerbi, M., Screpanti, V., Catrina, A. I., Bogen, B., Biberfeld, P., Grandien, A. (1999): The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *Journal of Experimental Medicine* 190 [7], 1025-1031. URL: ISI:000083021700015
- Dobbeling, U., Dummer, R., Laine, E., Potoczna, N., Qin, J. Z., Burg, G. (1998): Interleukin-15 is an autocrine/paracrine viability factor for cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood* 92 [1], 252-258.
- Dogan, T., Harms, G. S., Hekman, M., Karreman, C., Oberoi, T. K., Alnemri, E. S. *et al.* (2008): X-linked and cellular IAPs modulate the stability of C-RAF kinase and cell motility. *Nat Cell Biol* 10 [12], 1447-1455. URL: PM:19011619
- Dohrman, A., Russell, J. Q., Cuenin, S., Fortner, K., Tschopp, J., Budd, R. C. (2005): Cellular FLIP long form augments caspase activity and death of T cells through heterodimerization with and activation of caspase-8. *J Immunol* 175 [1], 311-318. URL: PM:15972663
- Dummer, R., Michie, S. A., Kell, D., Gould, J. W., Haeffner, A. C., Smoller, B. R. *et al.* (1995): Expression of bcl-2 protein and Ki-67 nuclear proliferation antigen in benign and malignant cutaneous T-cell infiltrates. *J Cutan Pathol* 22 [1], 11-17.
- Durkop, H., Latza, U., Hummel, M., Eitelbach, F., Seed, B., Stein, H. (1992): Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell* 68 [3], 421-427. URL: PM:1310894
- Duvic, M. und Vu, J. (2007): Update on the treatment of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL): Focus on vorinostat. *Biologics* 1 [4], 377-392. URL: PM:19707308
- Dvorak, H. F. (1986): Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315 [26], 1650-1659. URL: PM:3537791
- Eberle, J., Fecker, L. F., Forschner, T., Ulrich, C., Rowert-Huber, J., Stockfleth, E. (2007a): Apoptosis pathways as promising targets for skin cancer therapy. *British Journal of Dermatology* 156, 18-24. URL: ISI:000245947300004
- Eberle, J., Fecker, L. F., Hossini, A. M., Wieder, T., Daniel, P. T., Orfanos, C. E. *et al.* (2003): CD95/Fas signaling in human melanoma cells: conditional expression of CD95L/FasL overcomes the intrinsic apoptosis resistance of malignant melanoma and inhibits growth and progression of human melanoma xenotransplants. *Oncogene* 22 [57], 9131-9141. URL: ISI:000187149100003
- Eberle, J., Kurbanov, B. M., Hossini, A. M., Trefzer, U., Fecker, L. F. (2007b): Overcoming apoptosis deficiency of melanoma-hope for new therapeutic approaches. *Drug Resist Updat* 10 [6], 218-234. URL: PM:18054518
- Eckelman, B. P., Drag, M., Snipas, S. J., Salvesen, G. S. (2008): The mechanism of peptide-binding specificity of IAP BIR domains. *Cell Death Differ* 15 [5], 920-928. URL: PM:18239672

- Ellis, R. E., Yuan, J. Y., Horvitz, H. R. (1991): Mechanisms and Functions of Cell-Death. *Annual Review of Cell Biology* 7, 663-698. URL: ISI:A1991GP70000022
- Elwood, P. C., Gallagher, A. M., Duthie, G. G., Mur, L. A., Morgan, G. (2009): Aspirin, salicylates, and cancer. *Lancet* 373 [9671], 1301-1309. URL: PM:19328542
- Falschlehner, C., Schaefer, U., Walczak, H. (2009): Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology* 127 [2], 145-154. URL: PM:19476510
- Fanale, M. A. und Younes, A. (2007): Monoclonal antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Drugs* 67 [3], 333-350. URL: ISI:000245351400002
- Fecker, L. F., Schmude, M., Jost, S., Hossini, A. M., Pico, A. H., Wang, X. *et al.* (2010a): Efficient and selective tumor cell lysis and induction of apoptosis in melanoma cells by a conditional replication-competent CD95L adenovirus. *Exp Dermatol* 19 [8], e56-e66. URL: PM:19725869
- Fecker, L. F., Stockfleth, E., Braun, F. K., Rodust, P. M., Schwarz, C., Kohler, A. *et al.* (2010b): Enhanced death ligand-induced apoptosis in cutaneous SCC cells by treatment with diclofenac/hyaluronic acid correlates with downregulation of c-FLIP. *J Invest Dermatol* 130 [8], 2098-2109. URL: PM:20237495
- Fecker, L. F., Stockfleth, E., Nindl, I., Ulrich, C., Forschner, T., Eberle, J. (2007): The role of apoptosis in therapy and prophylaxis of epithelial tumours by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Br J Dermatol* 156 Suppl 3, 25-33. URL: PM:17488403
- Fink, S. L. und Cookson, B. T. (2005): Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity* 73 [4], 1907-1916. URL: ISI:000227975000001
- Fischer, U., Janicke, R. U., Schulze-Osthoff, K. (2003): Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation* 10 [1], 76-100. URL: ISI:000182179200012
- Fischer, U. und Schulze-Osthoff, K. (2005): Apoptosis-based therapies and drug targets. *Cell Death Differ* 12 Suppl 1, 942-961. URL: PM:15665817
- Fischer, U., Stroh, C., Schulze-Osthoff, K. (2006): Unique and overlapping substrate specificities of caspase-8 and caspase-10. *Oncogene* 25 [1], 152-159. URL: PM:16186808
- Fogh, J., Wright, W. C., Loveless, J. D. (1977): Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* 58 [2], 209-214. URL: PM:833871
- Foley, G. E., Lazarus, H., Farber, S., Uzman, B. G., Boone, B. A., McCarthy, R. E. (1965): Continuous Culture of Human Lymphoblasts from Peripheral Blood of A Child with Acute Leukemia. *Cancer* 18 [4], 522-&. URL: ISI:A19656307400016
- Foyil, K. V. und Bartlett, N. L. (2010): Anti-CD30 Antibodies for Hodgkin Lymphoma. *Curr Hematol Malig Rep* 5 [3], 140-147. URL: PM:20446121

- Franke, J. C., Plotz, M., Prokop, A., Geilen, C. C., Schmalz, H. G., Eberle, J. (2010): New caspase-independent but ROS-dependent apoptosis pathways are targeted in melanoma cells by an iron-containing cytosine analogue. *Biochem Pharmacol* 79 [4], 575-586. URL: PM:19799874
- Fricker, N., Beaudouin, J., Richter, P., Eils, R., Krammer, P. H., Lavrik, I. N. (2010): Model-based dissection of CD95 signaling dynamics reveals both a pro- and antiapoptotic role of c-FLIPL. *J Cell Biol* 190 [3], 377-389. URL: PM:20696707
- Froese, P., Lemke, H., Gerdes, J., Havsteen, B., Schwarting, R., Hansen, H. *et al.* (1987): Biochemical characterization and biosynthesis of the Ki-1 antigen in Hodgkin-derived and virus-transformed human B and T lymphoid cell lines. *J Immunol* 139 [6], 2081-2087. URL: PM:3040864
- Fulda, S. (2008): Modulation of TRAIL-induced apoptosis by HDAC inhibitors. *Curr Cancer Drug Targets* 8 [2], 132-140. URL: PM:18336196
- Fulda, S. (2009): Cell death in hematological tumors. *Apoptosis* 14 [4], 409-423. URL: PM:19130230
- Fulda, S. und Debatin, K. M. (2006): Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25 [34], 4798-4811. URL: ISI:000239687000016
- Galban, S., Brady, G. F., Duckett, C. S. (2008): Caspases and IAPs: a dance of death ensures cell survival. *Mol Cell* 32 [4], 462-463. URL: PM:19026777
- Galban, S. und Duckett, C. S. (2010): XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling. *Cell Death Differ* 17 [1], 54-60. URL: PM:19590513
- Galluzzi, L., Aaronson, S. A., Abrams, J., Alnemri, E. S., Andrews, D. W., Baehrecke, E. H. *et al.* (2009): Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death and Differentiation* 16 [8], 1093-1107. URL: ISI:000267948900004
- Georgakis, G. V., Li, Y., Humphreys, R., Andreeff, M., O'Brien, S., Younes, M. *et al.* (2005): Activity of selective fully human agonistic antibodies to the TRAIL death receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in primary and cultured lymphoma cells: induction of apoptosis and enhancement of doxorubicin- and bortezomib-induced cell death. *British Journal of Haematology* 130 [4], 501-510. URL: ISI:000230886600004
- Germain, R. N. (2002): T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2 [5], 309-322. URL: PM:12033737
- Geserick, P., Drewniok, C., Hupe, M., Haas, T. L., Diessenbacher, P., Sprick, M. R. *et al.* (2008): Suppression of cFLIP is sufficient to sensitize human melanoma cells to T. *Oncogene* 27 [22], 3211-3220. URL: PM:18084329
- Gierach, G. L., Lacey, J. V., Jr., Schatzkin, A., Leitzmann, M. F., Richesson, D., Hollenbeck, A. R. *et al.* (2008): Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer risk in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. *Breast Cancer Res* 10 [2], R38. URL: PM:18447943

- Giri, D. K. und Aggarwal, B. B. (1998): Constitutive activation of NF-kappa B causes resistance to apoptosis in human cutaneous T cell lymphoma HuT-78 cells - Autocrine role of tumor necrosis factor and reactive oxygen intermediates. *Journal of Biological Chemistry* 273 [22], 14008-14014. URL: ISI:000073919100090
- Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (2009): Mitochondria as targets for chemotherapy. *Apoptosis* 14 [4], 624-640. URL: PM:19205885
- Goldin, L. R. und Landgren, O. (2009): Autoimmunity and lymphomagenesis. *Int J Cancer* 124 [7], 1497-1502. URL: PM:19089924
- Golstein, P. und Kroemer, G. (2005): Redundant cell death mechanisms as relics and backups. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1490-1496. URL: PM:15818403
- Gomez-Benito, M., Balsas, P., Bosque, A., Anel, A., Marzo, I., Naval, J. (2005): Apo2L/TRAIL is an indirect mediator of apoptosis induced by interferon-alpha in human myeloma cells. *FEBS Lett* 579 [27], 6217-6222.
- Gomez-Santos, C., Francisco, R., Gimenez-Xavier, P., Ambrosio, S. (2007): Dopamine induces TNFalpha and TNF-R1 expression in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Neuroreport* 18 [16], 1725-1728. URL: PM:17921876
- Gootenberg, J. E., Ruscetti, F. W., Mier, J. W., Gazdar, A., Gallo, R. C. (1981): Human cutaneous T cell lymphoma and leukemia cell lines produce and respond to T cell growth factor. *J Exp Med* 154 [5], 1403-1418. URL: PM:6975346
- Goto, N., Tsurumi, H., Takemura, M., Hara, T., Sawada, M., Kasahara, S. *et al.* (2006): Serum-soluble tumor necrosis factor receptor 2 (sTNF-R2) level determines clinical outcome in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 77 [3], 217-225. URL: PM:16856931
- Greenhough, A., Smartt, H. J., Moore, A. E., Roberts, H. R., Williams, A. C., Paraskeva, C. *et al.* (2009): The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 30 [3], 377-386. URL: PM:19136477
- Greisser, J., Doebebling, U., Roos, M., Mueller, B., Schmid, M., Burg, G. *et al.* (2005): Apoptosis in CD30-positive lymphoproliferative disorders of the skin. *Experimental Dermatology* 14 [5], 380-385. URL: ISI:000228690200008
- Grilli, M., Goffi, F., Memo, M., Spano, P. (1996): Interleukin-1beta and glutamate activate the NF-kappaB/Rel binding site from the regulatory region of the amyloid precursor protein gene in primary neuronal cultures. *J Biol Chem* 271 [25], 15002-15007. URL: PM:8663145
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., Karin, M. (2010): Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140 [6], 883-899. URL: PM:20303878
- Grivennikov, S. I. und Karin, M. (2010): Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Curr Opin Genet Dev* 20 [1], 65-71. URL: PM:20036794

- Grosch, S., Maier, T. J., Schiffmann, S., Geisslinger, G. (2006): Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J Natl Cancer Inst* 98 [11], 736-747. URL: PM:16757698
- Groves, F. D., Linet, M. S., Travis, L. B., Devesa, S. S. (2000): Cancer surveillance series: Non-Hodgkin's lymphoma incidence by histologic subtype in the United States from 1978 through 1995. *Journal of the National Cancer Institute* 92 [15], 1240-1251. URL: ISI:000088521400012
- Guitart, J. (2006): Combination treatment modalities in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Semin Oncol* 33 [1 Suppl 3], S17-S20. URL: PM:16516671
- Gupta, R. A. und DuBois, R. N. (2001): Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* 1 [1], 11-21. URL: PM:11900248
- Gupta, S. und Gollapudi, S. (2005): Molecular mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in aging human T cell subsets. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 [5], 1034-1042. URL: ISI:000227872400014
- Gupta, S., Kass, G. E., Szegezdi, E., Joseph, B. (2009): The mitochondrial death pathway: a promising therapeutic target in diseases. *J Cell Mol Med* 13 [6], 1004-1033. URL: PM:19220575
- Gyrd-Hansen, M., Darding, M., Miasari, M., Santoro, M. M., Zender, L., Xue, W. *et al.* (2008): IAPs contain an evolutionarily conserved ubiquitin-binding domain that regulates NF-kappaB as well as cell survival and oncogenesis. *Nat Cell Biol* 10 [11], 1309-1317. URL: PM:18931663
- Gyrd-Hansen, M. und Meier, P. (2010): IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* 10 [8], 561-574. URL: PM:20651737
- Habens, F., Srinivasan, N., Oakley, F., Mann, D. A., Ganesan, A., Packham, G. (2005): Novel sulfasalazine analogues with enhanced NF-kB inhibitory and apoptosis promoting activity. *Apoptosis* 10 [3], 481-491. URL: PM:15909110
- Half, E. und Arber, N. (2009): Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention. *Expert Opin Pharmacother* 10 [2], 211-219. URL: PM:19236194
- Harada, H. und Grant, S. (2003): Apoptosis regulators. *Rev Clin Exp Hematol* 7 [2], 117-138. URL: PM:14763159
- Harris, R. E. (2007): Cyclooxygenase-2 (cox-2) and the inflammogenesis of cancer. *Subcell Biochem* 42, 93-126. URL: PM:17612047
- He, T. C., Chan, T. A., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1999): PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 99 [3], 335-345. URL: PM:10555149
- Heald, P. W., Yan, S. L., Edelson, R. L., Tigelaar, R., Picker, L. J. (1993): Skin-selective lymphocyte homing mechanisms in the pathogenesis of leukemic cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 101 [2], 222-226. URL: PM:7688404

- Hengartner, M. O. (2000): The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407 [6805], 770-776. URL: PM:11048727
- Hinds, M. G., Norton, R. S., Vaux, D. L., Day, C. L. (1999): Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat. *Nat Struct Biol* 6 [7], 648-651. URL: PM:10404221
- Hinterberger, M., Aichinger, M., da Costa, O. P., Voehringer, D., Hoffmann, R., Klein, L. (2010): Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance. *Nat Immunol* 11 [6], 512-519. URL: PM:20431619
- Hinz, B., Renner, B., Brune, K. (2007): Drug insight: cyclo-oxygenase-2 inhibitors--a critical appraisal. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3 [10], 552-560. URL: PM:17906610
- Hirsch, B., Hummel, M., Bentink, S., Fouladi, F., Spang, R., Zollinger, R. *et al.* (2008): CD30-induced signaling is absent in Hodgkin's cells but present in anaplastic large cell lymphoma cells. *Am J Pathol* 172 [2], 510-520. URL: PM:18187570
- Hitomi, J., Christofferson, D. E., Ng, A., Yao, J., Degterev, A., Xavier, R. J. *et al.* (2008): Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* 135 [7], 1311-1323. URL: PM:19109899
- Hopkins-Donaldson, S., Ziegler, A., Kurtz, S., Bigosch, C., Kandioler, D., Ludwig, C. *et al.* (2003): Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation. *Cell Death Differ* 10 [3], 356-364.
- Horwitz, S. M., Olsen, E. A., Duvic, M., Porcu, P., Kim, Y. H. (2008): Review of the treatment of mycosis fungoides and sezary syndrome: a stage-based approach. *J Natl Compr Canc Netw* 6 [4], 436-442. URL: PM:18433609
- Hosomi, Y., Yokose, T., Hirose, Y., Nakajima, R., Nagai, K., Nishiwaki, Y. *et al.* (2000): Increased cyclooxygenase 2 (COX-2) expression occurs frequently in precursor lesions of human adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer* 30 [2], 73-81. URL: PM:11086200
- Hossini, A. M. und Eberle, J. (2008): Apoptosis induction by Bcl-2 proteins independent of the BH3 domain. *Biochemical Pharmacology* 76 [11], 1612-1619. URL: ISI:000261569400030
- Hubinger, G., Schneider, C., Stohr, D., Ruff, H., Kirchner, D., Schwanen, C. *et al.* (2004): CD30-induced up-regulation of the inhibitor of apoptosis genes cIAP1 and cIAP2 in anaplastic large cell lymphoma cells. *Exp Hematol* 32 [4], 382-389. URL: PM:15050749
- Huls, G., Koornstra, J. J., Kleibeuker, J. H. (2003): Non-steroidal anti-inflammatory drugs and molecular carcinogenesis of colorectal carcinomas. *Lancet* 362 [9379], 230-232. URL: PM:12885487
- Igney, F. H. und Krammer, P. H. (2002a): Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2 [4], 277-288. URL: PM:12001989

- Igney, F. H. und Krammer, P. H. (2002b): Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *Journal of Leukocyte Biology* 71 [6], 907-920. URL: ISI:000176078500001
- Inoue, S., MacFarlane, M., Harper, N., Wheat, L. M., Dyer, M. J., Cohen, G. M. (2004): Histone deacetylase inhibitors potentiate TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in lymphoid malignancies. *Cell Death Differ* 11, S193-S206.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V. *et al.* (1997): Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388 [6638], 190-195. URL: PM:9217161
- Jana, N. R. (2008): NSAIDs and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 65 [9], 1295-1301. URL: PM:18292966
- Janssen, E. M., Droin, N. M., Lemmens, E. E., Pinkoski, M. J., Bensinger, S. J., Ehst, B. D. *et al.* (2005): CD4(+) T-cell help controls CD8(+) T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 434 [7029], 88-93. URL: ISI:000227334600049
- Jendrossek, V., Handrick, R., Belka, C. (2003): Celecoxib activates a novel mitochondrial apoptosis signaling pathway. *FASEB J* 17 [11], 1547-1549. URL: PM:12824303
- Josimovic-Alasevic, O., Durkop, H., Schwarting, R., Backe, E., Stein, H., Diamantstein, T. (1989): Ki-1 (CD30) antigen is released by Ki-1-positive tumor cells in vitro and in vivo. I. Partial characterization of soluble Ki-1 antigen and detection of the antigen in cell culture supernatants and in serum by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Eur J Immunol* 19 [1], 157-162. URL: PM:2537734
- Jost, P. J., Grabow, S., Gray, D., McKenzie, M. D., Nachbur, U., Huang, D. C. *et al.* (2009): XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* 460 [7258], 1035-1039. URL: PM:19626005
- Kadin, M. E. (2006): Pathobiology of CD30(+) cutaneous T-cell lymphomas. *Journal of Cutaneous Pathology* 33, 10-17. URL: ISI:000234674700004
- Kaltoft, K., Bisballe, S., Dyrberg, T., Boel, E., Rasmussen, P. B., Thestrupedersen, K. (1992): Establishment of 2 Continuous T-Cell Strains from A Single Plaque of A Patient with Mycosis-Fungoides. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 28A [3], 161-167. URL: ISI:A1992HJ63500005
- Kaltoft, K., Bisballe, S., Rasmussen, H. F., Thestrupedersen, K., Thomsen, K., Sterry, W. (1987): A Continuous T-Cell Line from A Patient with Sezary-Syndrome. *Archives of Dermatological Research* 279 [5], 293-298. URL: ISI:A1987J024200002
- Kang, Y. J., Mbonye, U. R., DeLong, C. J., Wada, M., Smith, W. L. (2007): Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. *Prog Lipid Res* 46 [2], 108-125. URL: PM:17316818
- Karin, M. (2006a): NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets. *Mol Carcinog* 45 [6], 355-361. URL: PM:16673382

- Karin, M. (2006b): Nuclear factor-kappa B in cancer development and progression. *Nature* 441 [7092], 431-436. URL: ISI:000237778900035
- Karin, M. (2009): NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1 [5], a000141. URL: PM:20066113
- Karst, A. M. und Li, G. (2007): BH3-only proteins in tumorigenesis and malignant melanoma. *Cellular and Molecular Life Sciences* 64 [3], 318-330. URL: ISI:000244390100006
- Kataoka, T. und Tschopp, J. (2004): N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway. *Mol Cell Biol* 24 [7], 2627-2636. URL: PM:15024054
- Kelly, P. N. und Strasser, A. (2011): The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ* URL: PM:21415859
- Kennedy, M. K., Willis, C. R., Armitage, R. J. (2006): Deciphering CD30 ligand biology and its role in humoral immunity. *Immunology* 118 [2], 143-152. URL: PM:16771849
- Kerr, J. F. (1995): Neglected opportunities in apoptosis research. *Trends Cell Biol* 5 [2], 55-57. URL: PM:14731406
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972): Apoptosis - Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer* 26 [4], 239-&. URL: ISI:A1972N215800001
- Kim, R., Emi, M., Tanabe, K. (2005): Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses. *Cancer Biol Ther* 4 [9], 924-933. URL: PM:16177562
- Kim, Y. H., Jensen, R. A., Watanabe, G. L., Varghese, A., Hoppe, R. T. (1996): Clinical stage IA (limited patch and plaque) mycosis fungoides. A long-term outcome analysis. *Arch Dermatol* 132 [11], 1309-1313. URL: PM:8915308
- King, J. und Laemmli, U. K. (1971): Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J Mol Biol* 62 [3], 465-477. URL: PM:5136579
- Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P. *et al.* (2001): Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 276 [49], 46639-46646.
- Klemke, C. D. und Goerdts, S. (2008): Molecular biology and targeted therapy of cutaneous T-cell lymphomas. *G Ital Dermatol Venereol* 143 [6], 365-374. URL: PM:19169209
- Kopp, E. und Ghosh, S. (1994): Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 265 [5174], 956-959. URL: PM:8052854
- Kopp, K. L., Kauczok, C. S., Lauenborg, B., Krejsgaard, T., Eriksen, K. W., Zhang, Q. *et al.* (2010): COX-2-dependent PGE(2) acts as a growth factor in mycosis fungoides (MF). *Leukemia* 24 [6], 1179-1185. URL: PM:20428208

- Krammer, P. H., Arnold, R., Lavrik, I. N. (2007): Life and death in peripheral T cells. *Nature Reviews Immunology* 7 [7], 532-542. URL: ISI:000247597300015
- Krangel, M. S. (2009): Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. *Curr Opin Immunol* 21 [2], 133-139. URL: PM:19362456
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H. *et al.* (2009): Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16 [1], 3-11. URL: PM:18846107
- Kroemer, G. und Jaattela, M. (2005): Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 5 [11], 886-897. URL: PM:16239905
- Kruyt, F. A. (2008): TRAIL and cancer therapy. *Cancer Lett* 263 [1], 14-25. URL: PM:18329793
- LaCasse, E. C., Mahoney, D. J., Cheung, H. H., Plenchette, S., Baird, S., Korneluk, R. G. (2008): IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* 27 [48], 6252-6275. URL: PM:18931692
- Ladetto, M., Vallet, S., Trojan, A., Dell'Aquila, M., Monitillo, L., Rosato, R. *et al.* (2005): Cyclooxygenase-2 (COX-2) is frequently expressed in multiple myeloma and is an independent predictor of poor outcome. *Blood* 105 [12], 4784-4791. URL: PM:15731178
- Lakshmikanthan, V., Kaddour-Djebbar, I., Lewis, R. W., Kumar, M. V. (2006): SAHA-sensitized prostate cancer cells to TNFalpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): mechanisms leading to synergistic apoptosis. *Int J Cancer* 119 [1], 221-228.
- Lansigan, F. und Foss, F. M. (2010): Current and emerging treatment strategies for cutaneous T-cell lymphoma. *Drugs* 70 [3], 273-286. URL: PM:20166766
- Lavrik, I., Golks, A., Krammer, P. H. (2005): Death receptor signaling. *Journal of Cell Science* 118 [2], 265-267. URL: ISI:000227102400001
- Lawrence, T. und Fong, C. (2010): The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF-kappaB. *Int J Biochem Cell Biol* 42 [4], 519-523. URL: PM:20026420
- Leitner, J., Grabmeier-Pfistershammer, K., Steinberger, P. (2010): Receptors and ligands implicated in human T cell costimulatory processes. *Immunol Lett* 128 [2], 89-97. URL: PM:19941899
- Levi, E., Wang, Z. X., Petrogiannis-Halioitis, T., Pfeifer, W. M., Kempf, W., Drews, R. *et al.* (2000): Distinct effects of CD30 and Fas signaling in cutaneous anaplastic lymphomas: A possible mechanism for disease progression. *Journal of Investigative Dermatology* 115 [6], 1034-1040. URL: ISI:000166285600017
- Li, H. L., Zhu, H., Xu, C. J., Yuan, J. Y. (1998): Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94 [4], 491-501. URL: ISI:000075541100011

- Li-Weber, M. und Krammer, P. H. (2003): Function and regulation of the CD95 (APO-1/Fas) ligand in the immune system. *Seminars in Immunology* 15 [3], 145-157. URL: ISI:000184400600004
- Lippens, S., Hoste, E., Vandenabeele, P., Agostinis, P., Declercq, W. (2009): Cell death in the skin. *Apoptosis* 14 [4], 549-569. URL: PM:19221876
- Liu, X., Plummer, S. J., Nock, N. L., Casey, G., Witte, J. S. (2006a): Nonsteroidal antiinflammatory drugs and decreased risk of advanced prostate cancer: modification by lymphotoxin alpha. *Am J Epidemiol* 164 [10], 984-989. URL: PM:16931544
- Liu, X., Yue, P., Schonthal, A. H., Khuri, F. R., Sun, S. Y. (2006b): Cellular FLICE-inhibitory protein down-regulation contributes to celecoxib-induced apoptosis in human lung cancer cells. *Cancer Res* 66 [23], 11115-11119. URL: PM:17145853
- Lockshin, R. A. und Williams, C. M. (1964): Programmed Cell Death .2. Endocrine Potentiation of the Breakdown of the Intersegmental Muscles of Silkworms. *Journal of Insect Physiology* 10 [4], 643-649. URL: ISI:A1964XF26700010
- Lockshin, R. A. und Zakeri, Z. (2004): Caspase-independent cell death? *Oncogene* 23 [16], 2766-2773. URL: PM:15077140
- Love, P. E. und Hayes, S. M. (2010): ITAM-mediated signaling by the T-cell antigen receptor. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 [6], a002485. URL: PM:20516133
- Lu, M., Lin, S. C., Huang, Y. H., Kang, Y. J., Rich, R., Lo, Y. C. *et al.* (2007): XIAP induces NF-kappa B activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization. *Molecular Cell* 26 [5], 689-702. URL: ISI:000247378000008
- MacFarlane, M. (2009): Cell death pathways--potential therapeutic targets. *Xenobiotica* 39 [8], 616-624. URL: PM:19622004
- MacLeod, M. K., Kappler, J. W., Marrack, P. (2010): Memory CD4 T cells: generation, reactivation and re-assignment. *Immunology* 130 [1], 10-15. URL: PM:20331469
- Maelfait, J. und Beyaert, R. (2008): Non-apoptotic functions of caspase-8. *Biochem Pharmacol* 76 [11], 1365-1373. URL: PM:18761323
- Magro, C. M. und Dyrsen, M. E. (2008): Cutaneous lymphocyte antigen expression in benign and neoplastic cutaneous B- and T-cell lymphoid infiltrates. *J Cutan Pathol* 35 [11], 1040-1049. URL: PM:18681860
- Mahalingam, D., Szegezdi, E., Keane, M., Jong, S., Samali, A. (2009): TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL? *Cancer Treat Rev* 35 [3], 280-288. URL: PM:19117685
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F. (2008): Cancer-related inflammation. *Nature* 454 [7203], 436-444. URL: PM:18650914
- Marelli-Berg, F. M., Cannella, L., Dazzi, F., Mirenda, V. (2008): The highway code of T cell trafficking. *J Pathol* 214 [2], 179-189. URL: PM:18161751

- Martinon, F. und Tschopp, J. (2007): Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* 14 [1], 10-22. URL: PM:16977329
- Mathas, S., Lietz, A., Anagnostopoulos, L., Hummel, F., Wiesner, B., Janz, M. *et al.* (2004): c-FLIP mediates resistance of Hodgkin/Reed-Sternberg cells to death receptor-induced apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 199 [8], 1041-1052. URL: ISI:000221039100002
- Mathiasen, I. S., Hansen, C. M., Foghsgaard, L., Jaattela, M. (2001): Sensitization to TNF-induced apoptosis by 1,25-dihydroxy vitamin D-3 involves up-regulation of the TNF receptor 1 and cathepsin B. *International Journal of Cancer* 93 [2], 224-231. URL: ISI:000169299200011
- Medzhitov, R. und Janeway, C. A., Jr. (2000): How does the immune system distinguish self from nonself? *Semin Immunol* 12 [3], 185-188. URL: PM:10910738
- Mehrotra, S., Languino, L. R., Raskett, C. M., Mercurio, A. M., Dohi, T., Altieri, D. C. (2010): IAP regulation of metastasis. *Cancer Cell* 17 [1], 53-64. URL: PM:20129247
- Mestel, D. S., Assaf, C., Steinhoff, M., Beyer, M., Moebs, M., Sterry, W. (2008): Emerging drugs in cutaneous T cell lymphoma. *Expert Opin Emerg Drugs* 13 [2], 345-361. URL: PM:18537525
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., Tschopp, J. (2001): NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 21 [16], 5299-5305. URL: PM:11463813
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D. W. *et al.* (2002): The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 277 [47], 45162-45171. URL: PM:12215447
- Minowada, J., Onuma, T., Moore, G. E. (1972): Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J Natl Cancer Inst* 49 [3], 891-895.
- Mir, S. S., Richter, B. W. M., Duckett, C. S. (2000): Differential effects of CD30 activation in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin disease cells. *Blood* 96 [13], 4307-4312. URL: ISI:000165709500039
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., Klionsky, D. J. (2008): Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451 [7182], 1069-1075. URL: PM:18305538
- Muller, A. M. S., Ihorst, G., Mertelsmann, R., Engelhardt, M. (2005): Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. *Annals of Hematology* 84 [1], 1-12. URL: ISI:000225473000001
- Nagasawa, T., Takakuwa, T., Takayama, H., Dong, Z., Miyagawa, S., Itami, S. *et al.* (2004): Fas gene mutations in mycosis fungoides: analysis of laser capture-microdissected specimens from cutaneous lesions. *Oncology* 67 [2], 130-134.

- Nakayama, T. und Yamashita, M. (2010): The TCR-mediated signaling pathways that control the direction of helper T cell differentiation. *Semin Immunol* 22 [5], 303-309. URL: PM:20488727
- Nathan, C. (2002): Points of control in inflammation. *Nature* 420 [6917], 846-852. URL: PM:12490957
- Newsom-Davis, T., Prieske, S., Walczak, H. (2009): Is TRAIL the holy grail of cancer therapy? *Apoptosis* 14 [4], 607-623. URL: PM:19194800
- Nicotera, P. und Merlino, G. (2004): Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* 23 [16], 2757-2765. URL: ISI:000220799600003
- Nicotera, P., Petersen, O. H., Melino, G., Verkhatsky, A. (2007): Janus a god with two faces: death and survival utilise same mechanisms conserved by evolution. *Cell Death and Differentiation* 14 [7], 1235-1236. URL: ISI:000247373400001
- Nussmeier, N. A., Whelton, A. A., Brown, M. T., Langford, R. M., Hoeft, A., Parlow, J. L. *et al.* (2005): Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery. *N Engl J Med* 352 [11], 1081-1091. URL: PM:15713945
- Oberst, A., Pop, C., Tremblay, A. G., Blais, V., Denault, J. B., Salvesen, G. S. *et al.* (2010): Inducible dimerization and inducible cleavage reveal a requirement for both processes in caspase-8 activation. *J Biol Chem* 285 [22], 16632-16642. URL: PM:20308068
- Oehadian, A., Koide, N., Mu, M. M., Hassan, F., Islam, S., Yoshida, T. *et al.* (2005): Interferon (IFN)-beta induces apoptotic cell death in DHL-4 diffuse large B cell lymphoma cells through tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Cancer Lett* 225 [1], 85-92.
- Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y. *et al.* (1993): Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 364 [6440], 806-809. URL: PM:7689176
- Ohsawa, M., Fukushima, H., Ikura, Y., Inoue, T., Shirai, N., Sugama, Y. *et al.* (2006): Expression of cyclooxygenase-2 in Hodgkin's lymphoma: its role in cell proliferation and angiogenesis. *Leuk Lymphoma* 47 [9], 1863-1871. URL: PM:17064999
- Orrenius, S., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B. (2007): Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 143-183. URL: PM:17029566
- Oyarzo, M. P., Medeiros, L. J., Atwell, C., Feretzaki, M., Leventaki, V., Drakos, E. *et al.* (2006): c-FLIP confers resistance to FAS-mediated apoptosis in anaplastic large-cell lymphoma. *Blood* 107 [6], 2544-2547. URL: ISI:000236014200053
- Pellegrini, M., Bath, S., Marsden, V. S., Huang, D. C., Metcalf, D., Harris, A. W. *et al.* (2005): FADD and caspase-8 are required for cytokine-induced proliferation of hemopoietic progenitor cells. *Blood* 106 [5], 1581-1589. URL: PM:15905188

- Peter, M. E., Legembre, P., Barnhart, B. C. (2005): Does CD95 have tumor promoting activities? *Biochim Biophys Acta* 1755 [1], 25-36.
- Pop, C. und Salvesen, G. S. (2009): Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* 284 [33], 21777-21781. URL: PM:19473994
- Pukac, L., Kanakaraj, P., Humphreys, R., Alderson, R., Bloom, M., Sung, C. *et al.* (2005): HGS-ETR1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 92 [8], 1430-1441.
- Reed, J. C. (2008): Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood* 111 [7], 3322-3330. URL: PM:18362212
- Reed, J. C. und Pellecchia, M. (2005): Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood* 106 [2], 408-418. URL: ISI:000230472100015
- Riccardi, C. und Nicoletti, I. (2006): Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 1 [3], 1458-1461. URL: PM:17406435
- Richardson, P. G., Mitsiades, C., Hideshima, T., Anderson, K. C. (2006): Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. *Annu Rev Med* 57, 33-47.
- Rishi, L., Gahlot, S., Kathania, M., Majumdar, S. (2009): Pentoxifylline induces apoptosis in vitro in cutaneous T cell lymphoma (HuT-78) and enhances FasL mediated killing by upregulating Fas expression. *Biochem Pharmacol* 77 [1], 30-45. URL: PM:18851957
- Roberts, R. A., Laskin, D. L., Smith, C. V., Robertson, F. M., Allen, E. M., Doorn, J. A. *et al.* (2009): Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicol Sci* 112 [1], 4-16. URL: PM:19656995
- Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayres, T. M., Goeddel, D. V. (1995): The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral-inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 83 [7], 1243-1252. URL: ISI:A1995TM76200019
- Rouzer, C. A. und Marnett, L. J. (2009): Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res* 50 Suppl, S29-S34. URL: PM:18952571
- Rubinson, D. A., Dillon, C. P., Kwiatkowski, A. V., Sievers, C., Yang, L. L., Kopinja, J. *et al.* (2003): A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nature Genetics* 33 [3], 401-406. URL: ISI:000181312700019
- Russell, J. H. und Ley, T. J. (2002): Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual Review of Immunology* 20, 323-370. URL: ISI:000175012600013
- Safa, A. R., Day, T. W., Wu, C. H. (2008): Cellular FLICE-like inhibitory protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 8 [1], 37-46. URL: PM:18288942

- Sallusto, F. und Lanzavecchia, A. (2009): Heterogeneity of CD4⁺ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol* 39 [8], 2076-2082. URL: PM:19672903
- Salvesen, G. S. und Dixit, V. M. (1999): Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [20], 10964-10967. URL: PM:10500109
- Samuelsson, B., Morgenstern, R., Jakobsson, P. J. (2007): Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacol Rev* 59 [3], 207-224. URL: PM:17878511
- Schaerli, P. und Moser, B. (2005): Chemokines: control of primary and memory T-cell traffic. *Immunol Res* 31 [1], 57-74. URL: PM:15591623
- Scherer WF, Syverton JT, Gey GO (1953): Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 97 [5], 695-710.
- Schiemann, W. P., Pfeifer, W. M., Levi, E., Kadin, M. E., Lodish, H. F. (1999): A deletion in the gene for transforming growth factor beta type I receptor abolishes growth regulation by transforming growth factor beta in a cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 94 [8], 2854-2861. URL: ISI:000083060000035
- Schneider, C. und Hubinger, G. (2002): Pleiotropic signal transduction mediated by human CD30: a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family. *Leuk Lymphoma* 43 [7], 1355-1366. URL: PM:12389614
- Schneider, C., Stohr, D., Merz, H., Hubinger, G. (2004): Signal transduction in anaplastic large cell lymphoma cells (ALCL) mediated by the tumor necrosis factor receptor CD30. *Leukemia & Lymphoma* 45 [5], 1009-1015. URL: ISI:000220063900019
- Schneider, U., Schwenk, H. U., Bornkamm, G. (1977): Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19 [5], 621-626. URL: PM:68013
- Schroder, K. und Tschopp, J. (2010): The inflammasomes. *Cell* 140 [6], 821-832. URL: PM:20303873
- Scott, F. L., Stec, B., Pop, C., Dobaczewska, M. K., Lee, J. J., Monosov, E. *et al.* (2009): The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature* 457 [7232], 1019-1022. URL: PM:19118384
- Sena-Esteves, M., Sacki, Y., Camp, S. M., Chiocca, E. A., Breakefield, X. O. (1999): Single-step conversion of cells to retrovirus vector producers with herpes simplex virus-Epstein-Barr virus hybrid amplicons. *J Virol* 73 [12], 10426-10439. URL: PM:10559361
- Shankar, S., Chen, X., Srivastava, R. K. (2005a): Effects of sequential treatments with chemotherapeutic drugs followed by TRAIL on prostate cancer in vitro and in vivo. *Prostate* 62 [2], 165-186. URL: PM:15389801

- Shankar, S., Singh, T. R., Fandy, T. E., Luetrakul, T., Ross, D. D., Srivastava, R. K. (2005b): Interactive effects of histone deacetylase inhibitors and TRAIL on apoptosis in human leukemia cells: involvement of both death receptor and mitochondrial pathways. *Int J Mol Med* 16 [6], 1125-1138.
- Shimizu, Y., Newman, W., Tanaka, Y., Shaw, S. (1992): Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol Today* 13 [3], 106-112. URL: PM:1622542
- Shin, M. S., Kim, H. S., Kang, C. S., Park, W. S., Kim, S. Y., Lee, S. N. *et al.* (2002): Inactivating mutations of CASP10 gene in non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 99 [11], 4094-4099. URL: PM:12010812
- Shiozaki, E. N., Chai, J., Rigotti, D. J., Riedl, S. J., Li, P., Srinivasula, S. M. *et al.* (2003): Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell* 11 [2], 519-527. URL: PM:12620238
- Shirley, S. und Micheau, O. (2010): Targeting c-FLIP in cancer. *Cancer Lett* URL: PM:21071136
- Smalley, W. E. und DuBois, R. N. (1997): Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Pharmacol* 39, 1-20. URL: PM:9160111
- Smith, C. A., Farrah, T., Goodwin, R. G. (1994): The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76 [6], 959-962. URL: PM:8137429
- Smith, C. A., Gruss, H. J., Davis, T., Anderson, D., Farrah, T., Baker, E. *et al.* (1993): CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. *Cell* 73 [7], 1349-1360. URL: PM:8391931
- Smith, J. L., Clein, G. P., Barker, C. R., Collins, R. D. (1973): Characterisation of malignant mediastinal lymphoid neoplasm (Sternberg sarcoma) as thymic in origin. *Lancet* 1 [7794], 74-77.
- Snell, V., Clodi, K., Zhao, S., Goodwin, R., Thomas, E. K., Morris, S. W. *et al.* (1997): Activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in haematological malignancies. *Br J Haematol* 99 [3], 618-624. URL: PM:9401075
- Sors, A., Jean-Louis, F., Pellet, C., Laroche, L., Dubertret, L., Courtois, G. *et al.* (2006): Down-regulating constitutive activation of the NF-kappa B canonical pathway overcomes the resistance of cutaneous T-cell lymphoma to apoptosis. *Blood* 107 [6], 2354-2363. URL: ISI:000236014200027
- Staber, P. B., Noehammer, C., Durkop, H., Schauer, S., Kenner, L., Linkesch, W. *et al.* (2006): mRNA expression patterns indicate CD30 mediated activation of different apoptosis pathways in anaplastic large cell lymphoma but not in Hodgkin's lymphoma. *Leuk Res* 30 [3], 343-348. URL: PM:16198418
- Starkebaum, G., Loughran, T. P., Waters, C. A., Ruscetti, F. W. (1991): Establishment of An Il-2 Independent, Human T-Cell Line Possessing Only the P70 Il-2 Receptor. *International Journal of Cancer* 49 [2], 246-253. URL: ISI:A1991GE54400017

- Stein, H., Foss, H. D., Durkop, H., Marafioti, T., Delsol, G., Pulford, K. *et al.* (2000): CD30(+) anaplastic large cell lymphoma: a review of its histopathologic, genetic, and clinical features. *Blood* 96 [12], 3681-3695. URL: ISI:000165514000004
- Stein, H., Mason, D. Y., Gerdes, J., O'Connor, N., Wainscoat, J., Pallesen, G. *et al.* (1985): The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood* 66 [4], 848-858. URL: PM:3876124
- Steinbach, G., Lynch, P. M., Phillips, R. K., Wallace, M. H., Hawk, E., Gordon, G. B. *et al.* (2000): The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 342 [26], 1946-1952. URL: PM:10874062
- Stennicke, H. R., Ryan, C. A., Salvesen, G. S. (2002): Reprieve from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem Sci* 27 [2], 94-101. URL: PM:11852247
- Su, H., Bidere, N., Zheng, L., Cubre, A., Sakai, K., Dale, J. *et al.* (2005): Requirement for caspase-8 in NF-kappaB activation by antigen receptor. *Science* 307 [5714], 1465-1468. URL: PM:15746428
- Subbaramaiah, K. und Dannenberg, A. J. (2003): Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol Sci* 24 [2], 96-102. URL: PM:12559775
- Subhashini, J., Mahipal, S. V., Reddanna, P. (2005): Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia in vitro. *Cancer Lett* 224 [1], 31-43. URL: PM:15911099
- Sugimoto, Y. und Narumiya, S. (2007): Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* 282 [16], 11613-11617. URL: PM:17329241
- Sulston, J. E. und Horvitz, H. R. (1977): Post-Embryonic Cell Lineages of Nematode, *Caenorhabditis-Elegans*. *Developmental Biology* 56 [1], 110-156. URL: ISI:A1977CY53300009
- Tait, S. W. und Green, D. R. (2008): Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene* 27 [50], 6452-6461. URL: PM:18955972
- Tait, S. W. und Green, D. R. (2010): Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 [9], 621-632. URL: PM:20683470
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., Martin, S. J. (2008): Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 [3], 231-241. URL: PM:18073771
- Testa, U. (2010): TRAIL/TRAIL-R in hematologic malignancies. *J Cell Biochem* 110 [1], 21-34. URL: PM:20336667
- Thomas, L. W., Lam, C., Edwards, S. W. (2010): Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett* 584 [14], 2981-2989. URL: PM:20540941

- Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinel, E., Neipel, F. *et al.* (1997): Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386 [6624], 517-521. URL: PM:9087414
- Thome, M. und Tschopp, J. (2001): Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol* 1 [1], 50-58. URL: PM:11905814
- Thun, M. J., Henley, S. J., Patrono, C. (2002): Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst* 94 [4], 252-266. URL: PM:11854387
- Timmer, J. C. und Salvesen, G. S. (2007): Caspase substrates. *Cell Death Differ* 14 [1], 66-72. URL: PM:17082814
- Tinel, A. und Tschopp, J. (2004): The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304 [5672], 843-846. URL: PM:15073321
- Tsujimoto, Y., Finger, L. R., Yunis, J., Nowell, P. C., Croce, C. M. (1984): Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226 [4678], 1097-1099. URL: PM:6093263
- Ulrich, M., Drecolli, U., Stockfleth, E. (2010): Emerging drugs for actinic keratosis. *Expert Opin Emerg Drugs* 15 [4], 545-555. URL: PM:20670178
- Uren, A. G., Pakusch, M., Hawkins, C. J., Puls, K. L., Vaux, D. L. (1996): Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 [10], 4974-4978. URL: ISI:A1996UL25500083
- Uwagawa, T., Li, Z., Chang, Z., Xia, Q., Peng, B., Sclabas, G. M. *et al.* (2007): Mechanisms of synthetic serine protease inhibitor (FUT-175)-mediated cell death. *Cancer* 109 [10], 2142-2153. URL: PM:17410536
- Vallabhapurapu, S. und Karin, M. (2009): Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 27, 693-733. URL: PM:19302050
- van Doorn, R., Dijkman, R., Vermeer, M. H., Starink, T. M., Willemze, R., Tensen, C. P. (2002): A novel splice variant of the Fas gene in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Res* 62 [19], 5389-5392.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., Kroemer, G. (2010): Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11 [10], 700-714. URL: PM:20823910
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., Berneman, Z. N. (2005): Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Annals of Hematology* 84 [10], 627-639. URL: ISI:000232340600001

- Wachmann, K., Pop, C., van Raam, B. J., Drag, M., Mace, P. D., Snipas, S. J. *et al.* (2010): Activation and specificity of human caspase-10. *Biochemistry* 49 [38], 8307-8315. URL: PM:20795673
- Wajant, H., Gerspach, J., Pfizenmaier, K. (2011): Engineering death receptor ligands for cancer therapy. *Cancer Lett* URL: PM:21236560
- Wang, D. und DuBois, R. N. (2006): Prostaglandins and cancer. *Gut* 55 [1], 115-122. URL: PM:16118353
- Wang, J., Zheng, L., Lobito, A., Chan, F. K., Dale, J., Sneller, M. *et al.* (1999): Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell* 98 [1], 47-58. URL: PM:10412980
- Wang, S. L. und El Deiry, W. S. (2003): TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene* 22 [53], 8628-8633. URL: ISI:000186720000008
- Ward, S. G. und Marelli-Berg, F. M. (2009): Mechanisms of chemokine and antigen-dependent T-lymphocyte navigation. *Biochem J* 418 [1], 13-27. URL: PM:19159344
- Warner, T. D., Giuliano, F., Vojnovic, I., Bukasa, A., Mitchell, J. A., Vane, J. R. (1999): Nonsteroid drug selectivities for cyclo-oxygenase-1 rather than cyclo-oxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [13], 7563-7568. URL: PM:10377455
- Whittaker, S. J. und Foss, F. M. (2007): Efficacy and tolerability of currently available therapies for the mycosis fungoides and Sezary syndrome variants of cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Treat Rev* 33 [2], 146-160. URL: PM:17275192
- Willemze, R., Jaffe, E. S., Burg, G., Cerroni, L., Berti, E., Swerdlow, S. H. *et al.* (2005): WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood* 105 [10], 3768-3785. URL: ISI:000229009000013
- Willers, J., Dummer, R., Kempf, W., Kundig, T., Burg, G., Kadin, M. E. (2003): Proliferation of CD30+ T-Helper 2 lymphoma cells can be inhibited by CD30 receptor cross-linking with recombinant CD30 ligand. *Clinical Cancer Research* 9 [7], 2744-2754. URL: ISI:000184108700048
- Williams, M. A. und Bevan, M. J. (2005): T cell memory: fixed or flexible? *Nat Immunol* 6 [8], 752-754. URL: PM:16034429
- Wong, B. C., Zhu, G. H., Lam, S. K. (1999): Aspirin induced apoptosis in gastric cancer cells. *Biomed Pharmacother* 53 [7], 315-318. URL: PM:10472431
- Wright, C. W. und Duckett, C. S. (2005): Reawakening the cellular death program in neoplasia through the therapeutic blockade of IAP function. *J Clin Invest* 115 [10], 2673-2678. URL: PM:16200201
- Wright, C. W., Rumble, J. M., Duckett, C. S. (2007): CD30 activates both the canonical and alternative NF-kappa B pathways in anaplastic large cell lymphoma cells.

- Journal of Biological Chemistry 282 [14], 10252-10262. URL: ISI:000245941000015
- Wu, J., Xia, H. H., Tu, S. P., Fan, D. M., Lin, M. C., Kung, H. F. *et al.* (2003): 15-Lipoxygenase-1 mediates cyclooxygenase-2 inhibitor-induced apoptosis in gastric cancer. *Carcinogenesis* 24 [2], 243-247. URL: PM:12584173
- Yanase, N., Hata, K., Shimo, K., Hayashida, M., Evers, B. M., Mizuguchi, J. (2005): Requirement of c-Jun NH2-terminal kinase activation in interferon-alpha-induced apoptosis through upregulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in Daudi B lymphoma cells. *Exp Cell Res* 310 [1], 10-21.
- Yang, Y. L. und Li, X. M. (2000): The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res* 10 [3], 169-177. URL: PM:11032169
- Yeh, W. C., Itie, A., Elia, A. J., Ng, M., Shu, H. B., Wakeham, A. *et al.* (2000): Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity* 12 [6], 633-642. URL: PM:10894163
- Youle, R. J. und Strasser, A. (2008): The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 [1], 47-59. URL: PM:18097445
- Yu, J. W., Jeffrey, P. D., Shi, Y. (2009): Mechanism of procaspase-8 activation by c-FLIPL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 [20], 8169-8174. URL: PM:19416807
- Zhang, C., Li, B., Gaikwad, A. S., Haridas, V., Xu, Z., Gutterman, J. U. *et al.* (2008): Avicin D Selectively Induces Apoptosis and Downregulates p-STAT-3, bcl-2, and Survivin in Cutaneous T-Cell Lymphoma Cells. *Journal of Investigative Dermatology* Ahead of print
- Zhang, C. L., Kamarashev, J., Qin, J. Z., Burg, G., Dummer, R., Dobbeling, U. (2003a): Expression of apoptosis regulators in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) cells. *Journal of Pathology* 200 [2], 249-254. URL: ISI:000183485900013
- Zhang, N. und He, Y. W. (2005): An essential role for c-FLIP in the efficient development of mature T lymphocytes. *J Exp Med* 202 [3], 395-404. URL: PM:16043517
- Zhang, X. R., Zhang, L. Y., Devadas, S., Li, L., Keegan, A. D., Shi, Y. F. (2003b): Reciprocal expression of TRAIL and CD95L in Th1 and Th2 cells: role of apoptosis in T helper subset differentiation. *Cell Death Differ* 10 [2], 203-210.
- Zhivotovsky, B. und Orrenius, S. (2010): Cell death mechanisms: cross-talk and role in disease. *Exp Cell Res* 316 [8], 1374-1383. URL: PM:20211164
- Zoi-Toli, O., Vermeer, M. H., de Vries, E., Van Beek, P., Meijer, C. J. L. M., Willemze, R. (2000): Expression of Fas and Fas-ligand in primary cutaneous T-cell lymphoma (CTCL): association between lack of Fas expression and aggressive types of CTCL. *British Journal of Dermatology* 143 [2], 313-319. URL: ISI:000088993600012

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
$\Delta\Psi_m$	Mitochondriales Membranpotential
A	
A1/Bfl-1	Bcl-2-related protein A1
ABTS	2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)] diammoniumsalz
AIF	Apoptosis inducing factor
ALCL	Anaplastic large cell lymphoma
APS	Ammoniumperoxodisulfate
ATCC	American Type Culture Collection
ATL	Adult T cell lymphoma/leukemia
ATP	Adenosine triphosphate
APC	Antigen-präsentierende Zelle
B	
bp (kb)	Base pair (kilo base pair)
BAFF	B cell activating factor
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bax	Bcl-2 associated protein X
BCA	Bicinchonin acid
Bcl-2	B-cell lymphoma/leukemia-2
Bcl-x _L	Bcl-2-like 1 long
Bcl-x _S	Bcl-2-like 1 short
Bcl-x _{AK}	Bcl-2-like 1 atypical killer
BIR	Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat
Bid	BH3-interacting domain death agonist
Bik/Nbk	Bcl-2 interacting killer/Natural born killer
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
Bmf	Bcl-2 modifying factor
BNIP3	Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3
Bok	Bcl-2-related ovarian killer
BSA	Bovine serum albumine
C	
Cyt c	Cytochrom C
CARD	Caspase recruitment domain
Caspase	Cysteine-aspartate specific protease
CD	Cluster of differentiation
CD95L	CD95 ligand
cDNS	Complementary DNS
CMV	Cytomegalovirus
c-FLIP	Cellular FLICE inhibitory protein
c-IAP	Cellular inhibitor of apoptosis
CrmA	Cytokine response modifier A
CTCL	Cutaneous T cell lymphoma
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CTLA	Cytotoxic T-lymphocyte antigen

D

DcR	TRAIL Decoy receptor
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DIABLO	Direct IAP binding protein with low pI
DISC	Death inducing signalling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNS	Desoxynukleinsäure
DR	Death receptor
DTT	Dithiothreitol

E

ECL	Enhanced chemiluminescence
EGFP	Enhanced GFP
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
ERK	Extracellular signal-regulated kinase

F

FAP	Familiäre adenomatöse polyposis
FCS	Fetal calf serum
FSC	Forward scatter

G

g	Gramm
---	-------

H

h	Stunde
HDACi	Histon-Deacetylase-Inhibitor
HRP	Horseradishperoxidase
HtrA2/Omi	High temperature requirement A2

I

IBM	IAP-binding motif
ICAD	Inhibitor of caspase-activated DNase
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B kinase
I κ B	Inhibitor of κ B proteins
IFN- α	Interferon alpha

J

JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro 1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl carbocyaniniodide
JNK	C-Jun N-terminal kinase

K

kDa	Kilodalton
-----	------------

L

LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen1
-------	-----------------------------------------

M

min	Minute
mAb	Monoclonal antibody
Mcl-1	Myeloid cell leukaemia sequence-1
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEKK	MAPK/ERK kinase kinase
MF	Mycosis fungoides
MHC	Major histocompatibility complex
MOI	Multiplicity of infection
MOMP	Mitochondrial outer membrane permeabilization
mRNA	Messenger ribonucleic acid

N

Nbk/Bik	Natural born killer/Bcl-2-interacting killer
NIK	NF- κ B-inducing kinase
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
Noxa	angelehnt an das griechische Wort schädlich
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug
N-Terminus	Amino-Terminus

O

OD	Optische Dichte
----	-----------------

P

pH	Potentia hydrogenii
p35	p35 – baculovirus encoded inhibitor
PARP	Poly ADP ribose polymerases
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphat-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PI	Propidium iodide
PIDD	p53-induced protein with death domain
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
Puma	p53 upregulated modulator of apoptosis

Q

R

RAIDD	RIP-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with death domain
RIP	Receptor-interacting protein
RING	Really interesting new gene
Rnase	Ribonuclease
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA interference
RNS	Reactive nitrogene species
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transcription PCR
ROS	Reactive oxygen species
Rpm	Rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

S

SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SD	Standardabweichung
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
SSC	Side scatter
SzS	Sézary-Syndrom

T

tBid	Truncated Bid
TCR	T cell antigen receptor
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamin
TM	Transmembrane domain
TNF- α	Tumour necrosis factor alpha
TALL	T cell acute lymphocytic leukaemia
TNF-R	TNF receptor
TRADD	TNFR1-associated death domain protein
TRAF	TNFR-associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAIL-R	TRAIL receptor
Tris	Tris-[hydroxymethyl]amino-methane
TBS	Tris-buffered saline

U

Ub	Ubiquitin
UBA	Ubiquitin-associated

V

VLA-4	Very late antigen-4
VDAC	Voltage dependent anion channel
VSV-G	Vesicular stomatitis virus

W

X

XIAP	X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein
------	----------------------------------------------------

Y

Z

Publikationsliste

Aus dieser Arbeit sind folgende Publikationen hervorgegangen:

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) induce apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cells and enhances sensitivity for TRAIL by c-FLIP downregulation.

Frank K. Braun, Nadya Al-Yacoub, Michael Plötz, Markus Möbs, Wolfram Sterry, Jürgen Eberle

J Invest Dermatol., 2011

Apoptosis induction in cutaneous T-cell lymphoma cells by the histone deacetylase inhibitor SAHA encloses TRAIL-mediated pathways.

Nadya Al-Yacoub, **Frank K. Braun**, Markus Möbs, Wolfram Sterry, Jürgen Eberle

British Journal of Dermatolog, 2011 [manuscript submitted]

Tumor suppressor TNFAIP3 (A20) is frequently deleted in Sézary syndrome.

Floriane Braun*, Piotr Grabarczyk*, Markus Möbs, Marc Beyer, **Frank K. Braun**, Jürgen Eberle, Wolfram Sterry, Franka Busse, Josephine Schröder, Grzegorz K. Przybylski, Christian A. Schmidt

Leukemia, 2011; PMID: 21625233

cFLIP diminishes CD95-induced apoptosis of CD30-stimulated cutaneous anaplastic large T cell lymphoma (cALCL) cells.

Burkhard Hirsch, **Frank K. Braun**, Nadya Al-Yacoub, Chalid Assaf, Marshall E. Kadin, Wolfram Sterry, Jürgen Eberle, Horst Dürkop

Pathologe, 2010; PMID: 20812013

Enhanced death ligand-induced apoptosis in cutaneous SCC cells by treatment with Diclofenac/hyaluronic acid correlates with downregulation of c-FLIP.

Lothar F. Fecker, Eggert Stockfleth, **Frank K. Braun**, Paul M. Rodust, Constanze Schwarz, Anja Köhler, Martin Leverkus, Jürgen Eberle

J Invest Dermatol., 2010; PMID: 20237495

Resistance of cutaneous anaplastic large-cell lymphoma cells to apoptosis by death ligands is enhanced by CD30-mediated overexpression of c-FLIP.

Frank K. Braun, Burkhard Hirsch, Nadya Al-Yacoub, Horst Dürkop, Chalid Assaf, Marshall E. Kadin, Wolfram Sterry, Jürgen Eberle

J Invest Dermatol., 2010; PMID: 19890350

Blockade of death receptor-mediated pathways early in the signaling cascade coincides with distinct apoptosis resistance in cutaneous T-cell lymphoma cells.

Frank K. Braun, Lothar F. Fecker, Constanze Schwarz, Peter Walden, Chalid Assaf, Horst Dürkop, Wolfram Sterry, Jürgen Eberle

J Invest Dermatol., 2007; PMID: 17495957

Kongressbeiträge

Aus dieser Arbeit sind folgende Kongressbeiträge hervorgegangen:

Jahr	Kongress
2011	XXXVIII Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Tübingen
	6. Treffen der ADF-AG „Kutane Lymphome“, Tübingen (<u>Vortrag</u>)
	5 th International Symposium on the Biology and Immunology of Cutaneous Lymphomas, Berlin (<u>Vortrag</u>)
2010	6 th Swiss Apoptosis Meeting, Bern, Schweiz
	1 th World Congress of Cutaneous Lymphoma, Chicago, USA
	15 th Congress of the European Hematology Association, Spanien
2009	17 th Annual Meeting of the European Cell Death Organization (ECDO), Paris
2008	18. Jahrestagung Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie (ADO), Berlin (<u>Vortrag</u>)
	4 th International Symposium on the Biology and Immunology of Cutaneous Lymphomas, Berlin
	Apoptosis World, Luxemburg
2007	XXXIV Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Freiburg

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Jürgen Eberle für das Überlassen des interessanten Themas, aber auch für seine Anleitung und stete Unterstützung in allen wissenschaftlichen Fragen. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfram Sterry für die kontinuierliche Unterstützung des Projektes bedanken. Überdies danke ich Frau Dr. Michal Or-Guil für die Übernahme der Betreuung und der Vertretung gegenüber der Humboldt-Universität zu Berlin.

Schließlich möchte ich mich auch bei allen jetzigen und allen ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe, für die Unterstützung bei der Suche nach Lösungen, der regen fachlichen Diskussionen sowie dem sehr angenehmen und stets freundschaftlichen Arbeitsklima bedanken.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Frank Karl Horst Braun, an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und alle verwendeten Hilfsmittel und Quellen als solche ausgewiesen habe.

Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie in dieser oder anderer Form Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war sowie dass ich mich noch nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen solchen bereits besitze.

Die dem angestrebten Promotionsverfahren an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Berlin, den 9. September 2011

Frank K. Braun